Spitalul Clinic de Boli Infecţioase
”Sf.Parascheva„ Iaşi
Laboratorul de analize medicale
IASI, Str.Octav Botez Nr 2

PROCEDURA SPECIFICA

EXAMENUL COPROPARAZITOLOGIC

COD: PSL – M2 - 01

Editia 1, Revizia 0

Din data de 01.05.2013

APROBAT
Manager tehnic
Dr. Rodica Fântânaru

VERIFICAT
Responsabil calitate
As. Lorena Zaborila

Elaborat:
Responsabil analiza
Dr. Rodica Fântânaru

DIFUZAT IN REGIM CONTROLAT

EXEMPLAR Nr.

Avertisment : Documentul de fata este proprietatea Spitalului Clinic de Boli Infecţioase ”Sf.Parascheva„ Iaşi - Laboratorul de analize medicale. Reproducerea si difuzarea documentului sunt in exclusivitate dreptul laboratorului

LISTA DE DIFUZARE / RETRAGERE

Difuzat la	Primit				Retras			
	Nr. ex.	Data	Nume	Semnătură	Nr. ex.	Data	Nume	Semnătură
RC	0.	01.05.2013	As.Lorena Zaborila					
Manager General	1.	01.05.2013	Prof.Dr. Carmen Dorobăţ					
Manager Tehnic	2.	01.05.2013	Dr. Rodica Fântânaru					
Responsabil analiza	3.	01.05.2013	Dr. Rodica Fântânaru					

INDICATORUL REVIZIILOR

Nr. Crt	Data	Editia/ revizia	Identificari modificare Capitol, subcapitol, pagina modificata, continut modificari	Functia si semnatura		
				Elaborat	Verificat	Aprobat

0. CUPRINS

CAPITOLUL

0 Scop

1 Domeniu de aplicare

2 Documente de referinţă

3 Definiţii şi abrevieri

4 Principiul metodei

5 Măsuri de siguranţă

6 Procedura de lucru

7 Raportare rezultate

8 Validare rezultate

9 Surse de eroare

10 Reponsabilitati

11 Inregistrări

1.SCOP

Scopul acestei proceduri este de a prezenta modul de organizare şi desfăşurare a etapelor examenului parazitologic în conformitate cu cerinţele impuse de normele de calitate în vigoare, în vederea demonstrării competenţei laboratorului nostru.

2. DOMENIU DE APLICARE

Prezenta procedură este aplicată în compartimentul Microbiologie 2 pentru diagnosticul infecţiilor cu protozoare (amibiaza, giardioza, coccidioze intestinale, balantidioza) şi infestaţiilor cu helminţi (ascaridioza, tricocefaloza, strongiloidoza, anchilostomiaza, teniaze, himenolepidoze).

3. DOCUMENTE DE REFERINŢĂ

• Compendiu de parazitologie clinică – Ion Gherman Editura ALL-Bucuresti 1993

• Parazitologie medicală - Simona Radulescu , Ernest A. Meyer Editura ALL-Bucuresti 1994

• Tratat de microbiologie clinică –Dumitru Buiuc si Marian Negut-2008

• Metodologia anuală de supraveghere şi control a bolii diareice acute (BDA) şi holerei pentru sezonul iunie-noiembrie – Autoritatea de Sănătate Publică

4. TERMENI ŞI DEFINIŢII

4.1 Protozoare- sunt organisme eucariote,care fac parte din regnul animal, în care fiecare unitate celulară îndeplineşte toate funcţiile necesare vieţii. Se prezintă în doua stadii, stadiul de trofozoit – forma vegetativă liberă şi stadiul de chist – forma de rezistenţă în mediul intern şi extern. Protozoarele parazite ale omului, ce pot fi întâlnite în materiile fecale, sunt grupate în cinci clase

1. Sarcodina cu ordinul Amoebina:

   - Dientamoeba fragilis
   - Entamoeba histolitica
   - Entamoeba coli
   - Entamoeba hartmani
   - Endolimax nana
   - Iodamoeba buetschili

2. Mastogophora cu ordinul Protomonadina
   - Giardia lamblia
   - Chilomastix mesnili
   - Trichomonas hominis

3. Ciliata
   - Balantidium coli

4. Sporozoa
   - Cryptosporidium parvum
   - Isospora belii
   - Sarcocystis hominis

5. Clasificare incertă
   - Blastocystis hominis

Helminţi - sunt viermi paraziţi ce cuprind două încrengături :

1. Plathelminţi (viermii plaţi) ce conţin două clase:
   - Trematode (Fasciola hepatica)
   - Cestode (Diphylobothrium latum, Taenia spp., Hymenolepis spp., Dyphilidium caninum)

2. Nemathelminţi (viermi cilindrici cu corpul nesegmentat, cu extremităţile ascuţite sau rotunjite) din care de importanţă medicală, este clasa Nematoda cu urmatoarele grupe:
   - Trichinellidae (Trichiura trichuris)
   - Oxiuroides (Enterobius vermicularis)
   - Ascaroides (Ascaris lumbricoides, Toxocara canis)
   - Ancylostomatoides (Ancylostoma duodenale, Necanor americanus)
   - Trychostrongiloides (Trychostrongylus)
   - Rabditoides (Strongyloides stercoralis)
   - Metastrongyloides
   - Dracunculoides

4.2 PRESCURTĂRI

BDA – boală diareică acută

SF – Ser fiziologic

5. PRINCIPIUL METODEI

Evidenţierea directă a parazitului în materiile fecale ale bolnavului.Paraziţii intestinali şi biliari sunt diagnosticaţi prin descoperirea lor în fecale sau alt material intestinal (aspirat duodenal, aspirat sigmoidian).

Deoarece unii paraziţi sunt eliminaţi intermitent sau în număr fluctuant, examinarea unei singure probe de fecale nu este suficientă pentru a detecta toţi paraziţii existenţi. Testarea a 3 probe colectate la interval de 5-7 zile va imbunataţii substanţial rezultatul.

6. MĂSURI DE SIGURANŢĂ

6.1 Protecţia personalului

• Purtarea pe tot timpul activităţii a halatului de protecţie curat, corect încheiat şi

• Echipamentul de protecţie se lasă la locul de lucru ori de câte ori se deplasează în alte zone de activitate (în afara laboratorului).

• Se spală mâinile după orice manipulare de material infecţios şi înainte de a părăsi aria de lucru.

• Se protejează sub pansament hidrofug orice soluţie de continuitate de pe tegumentul expus (zgârieturi, tăieturi).

• Se etichetează cu însemnul riscului biologic probele care vin de pacienţii cu hepatită sau SIDA, sau se specifică acest diagnostic pe formularul de cerere analiză.

• La locul de lucru nu se introduc în gură pixuri, creioane, degete, alimente, băuturi, ţigări.

• Nu se utilizează sticlarie ciobită sau fisurată.

• Se manipulează cu grijă substanţele chimice.

• Dezinfectează suprafeţele de lucru la terminarea activităţii şi după orice vărsare de produs infecţios sau ori de câte ori se suspectează o contaminare accidentală.

• Semnalarea şefului de laborator a oricarei infecţii intercurente – poate fi o infecţie profesională.

• Se efectuează controlul medical periodic.

• Se asigură accesul controlat al persoanelor străine în laborator.

• Se respectă instrucţiunile privind eliminarea deşeurilor infecţioase.

6.2 Protecţia Echipamentelor

• Se verifică periodic lupa binoculară şi microscopul.

• Se verifică permanent valabilitatea reactivilor,etc.

6.3 Reactivi şi alte Substanţe

Reactivi

- Soluţie Lugol
- Soluţie Lugol dublu
  - Iod metaloid 1g
  - Iodură de potasiu 2g
  - Apă distilată 100ml

În cazul în care iodul nu se dizolvă bine în soluţia iniţială foarte concentrată de iodură de potasiu se adaugă o foarte mica cantitate de alcool.

- Ser fiziologic
- Soluţie fucsină fenicată
  - Fuxină bazică 10 g
  - Alcool etilic absolut 100
  - Fenol 50 g
- Soluţie apoasă verde malachit 5%
- Alcool metilic 70%
- Acid sulfuric concentrat
- Soluţie albastru metilen

- Amestec sulfocromic pentru lame
  - Bicromat de potasiu 50g
  - Acid sulfuric tehnic concentrat 500ml
  - Apă distilată 450ml

- Amestec sulfocromic pentru pipete :
  - Bicromat de potasiu 50g
  - Acid sulfuric tehnic concentrat 150ml
  - Apă distilată 1000ml

- Solutie clorinată (1 tableta Clorom / 0,6 l apa)
- Mediu Cary-Blair

6.4 Echipamente si Resurse

Denumirea echipametului, tip	Producator	Seria	Personal autorizat pentru exploatare
Microscop binocular			da
Frigider pentru pastrarea probelor			
Coprorecoltoare			
Pensă anatomică			

6.5 Probe Biologice Primare

6.5.1 Recoltare

Pentru recoltare se folosesc coprocultoare din material plastic cu linguriţă colectoare şi capac înşurubat, de unică utilizare, conţinând mediu de transport Cary –Blair care menţine şi viabilitatea trofozoizilor. Cele mai multe izolări se obţin din fecale proaspete, emise spontan. Cu ajutorul linguriţei coprocultorului se prelevă porţiuni cu mucus şi eventual urme de sânge, iar când acestea lipsesc se recoltează boluri din 2-3 locuri diferite. Cantitatea necesară este de 5-15 g, iar dacă fecalele sunt lichide recoltorul trebuie umplut pe jumătate. Proba se etichetează şi se completează formularul de solicitare analize, cu examenul cerut.

La bolnavii cronici, purtători, se recomandă şi examenul parazitologic după administrarea unui purgativ salin. Deoarece în emisia chiştilor de Giardia intervin perioade negative, analiza coproparazitologică se repetă de minimum 3 ori, la interval de 5-7 zile, iar dacă se suspectează o amibiază se recomandă examinarea a 6 probe: 3 din fecale emise spontan şi 3 după administrarea unui purgativ salin.Examenul coprologic de control în cazul unei infecţii cu protozoare se face după 3-4 săptămâni iar în cazul unei infecţii cu helminţi după 1-2 săptămâni.

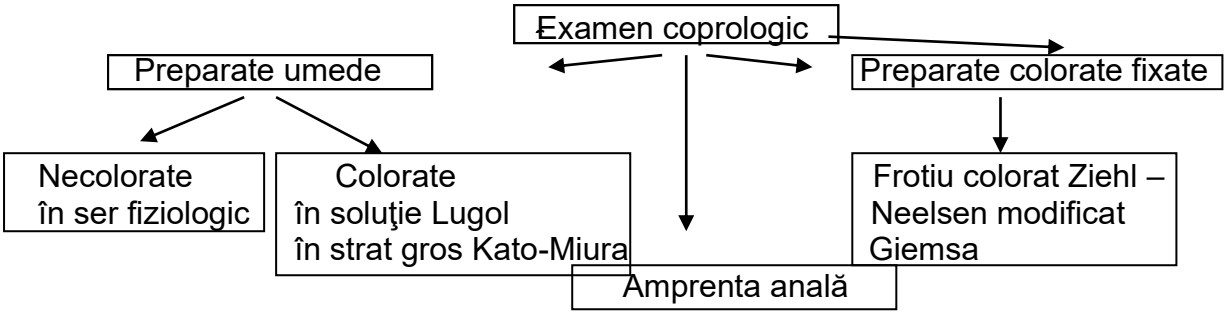
6.5.2Transport

Prelevatele de materii fecale destinate examenelor parazitologice se transportă la laborator în cel mai scurt timp (2 ore de la prelevare) în coprorecoltoare cu mediu de transport Cary-Blair.

6.5.3 Inregistrare probe

Probele acceptate se inregistreaza in Registrul de comenzi interne/externe Cod RGL – 4.4 – 01 I / E iar cele respinse de la procesare in Registrul comenzi respinse Cod RGL – 4.4 – 02 ; la nivelul compartimentului se inregistreaza in Registrul de analize Cod RGL – 4.4 – 01 – I - Materii fecale si in sistemul informatic.

7. PROCEDURA DE LUCRU



7.1 Examenul microscopic direct in soluţie Lugol.

Se examinează între lamă şi lamelă o cantitate mică de materii fecale,prelevată din diferite părţi ale scaunului,omogenizată în Lugol (1 picatură).Soluţia de Lugol colorează membrana chiştilor şi detaliile de structură internă. Coloreaza de asemeni amidonul în diferite nuanţe de violet în funcţie de stadiul de digestie.

Preparatul se examinează cât mai repede,deoarece odată uscat devine imposibil de citit. Se folosesc lamele de 20/20 mm astfel încât marginile lor să fie cuprinse în marginile lamelei.

Examinarea se face cu obiectiv 10x iar identificarea fiecărui element parazitar se face cu obiectiv 40x. Stratul care se examinează nu trebuie să fie prea gros pentru a nu provoca opacifierea câmpului microscopic. Prin această metodă chiştii de protozoare se colorează în galben brun şi prezintă detalii de structură accentuate.Trofozoizii de protozoare sunt omorâţi şi în lipsa mişcărilor caracteristice sunt greu de identificat. Ouăle de helminţi apar colorate în brun roşcat intens,cu detalii de structură accentuate. Larvele de Strongyloides stercoralis sunt mărite, drepte cu detalii de structură foarte nete.

7.2 Examenul microscopic direct cu ser fiziologic.

Suspensia de materii fecale se face în ser fiziologic care păstreaza viabilitatea trofozoizilor de protozoare sau a larvelor de helminti, precum şi culoarea naturală a elementelor parazitare.

Pe o lamă se pune o picătură de ser fiziologic. Cu ajutorul unei anse metalice sau a unei baghete se prelevă o mică cantitate din proba de examinat şi se omogenizează pe lamă cu o picatură de ser fiziologic.Se acoperă cu o lamelă.

Se examinează cât mai repede posibil, pentru ca preparatul odată uscat,devine imposibil de examinat.

Suspensia trebuie să fie uniformă iar lamela asezata orizontal, nu inclinată.Se examinează cu obiectivul 10x iar identificarea fiecarui element se face cu obiectivul 40x.

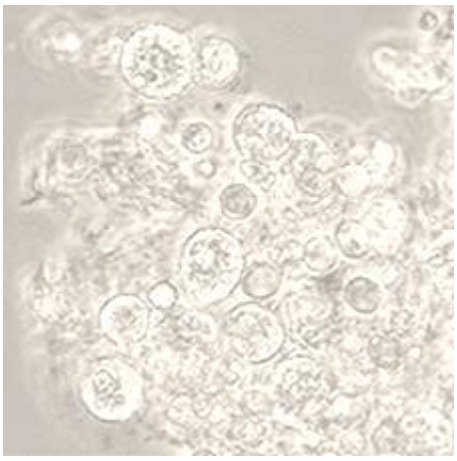
În preparatul direct se poate decela şi identifica orice element parazitar,cu condiţia ca intensitatea parazitară a probei să fie suficientă. Metoda este universală, are indicaţii speciale pentru decelarea trofozoizilor de protozoare vii care au mişcări caracteristice.

Chiştii de protozoare apar foarte refringenţi, decelându-se cu uşurinţă, în schimb nu prezintă detalii de structură aşa cum prezintă în soluţia Lugol.

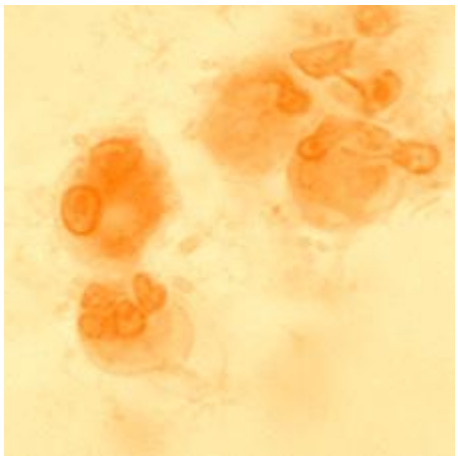
Ouăle de helminţi prezintă toate detaliile de structură şi culoarea reală. În ouăle embrionate, ca cele de tenie, himenolepis, oxiuri cu larvă, se observă mişcările periodice ale larvei sau embrionului.

Larvele rabditoide de Strongyloides stercoralis prezintă mişcări vioaie şi se deplasează repede sub lamela.

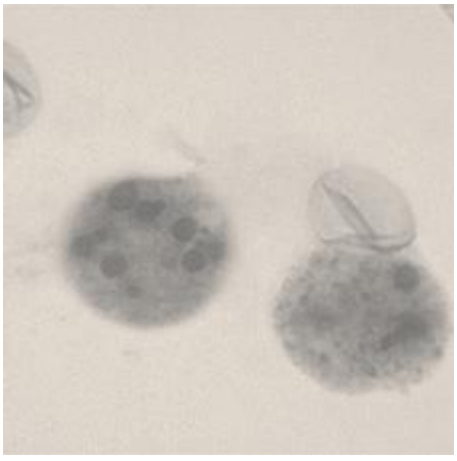
Concomitent se consemnează prezenţa/ absenţa leucocitelor în număr mare (reacţia inflamatorie cu sau fără prezenţa hematiilor)



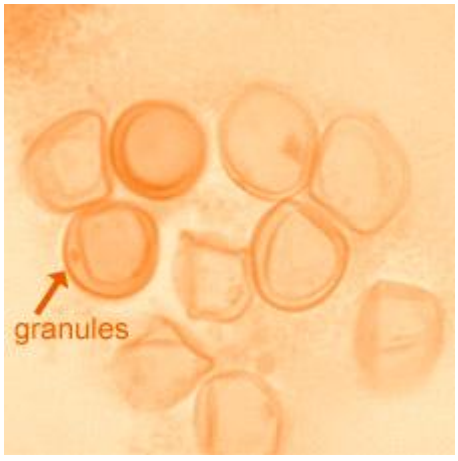
Leucocite(SF)



Leucocite în Lugol



Macrofage şi o hematie in SF

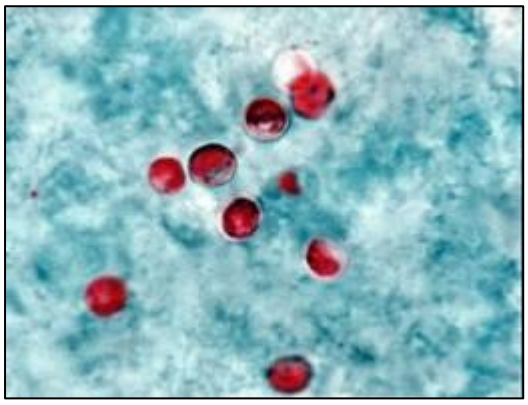


Hematii în Lugol

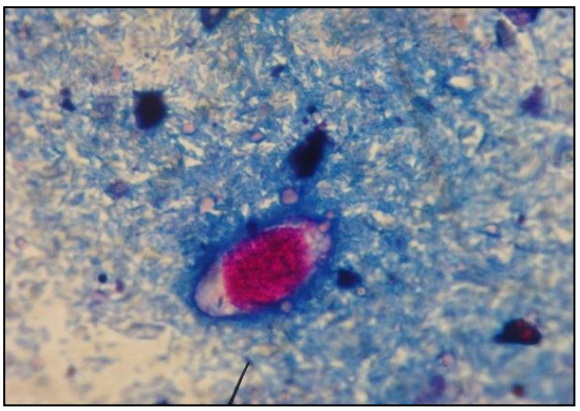
7.3 Examenul microscopic al frotiului coloraţie Ziehl Neelsen modificată

Coloraţia Ziehl Neelsen modificată:
- din probele de scaun se întind frotiuri subţiri care se usucă la temperatura camerei
- se fixează cu metanol 70%
- se colorează cu fuxină fenicată rece 30 minute
- se spală cu apă sau apă distilată
- se decolorează cu acid sulfuric concentrat 20 secunde
- se recolorează cu soluţie apoasă de verde malachit 5% 3 minute
- se spală şi se usucă

Examinarea se face cu obiectivul imersie 120x. Oochiştii apar ca formaţiuni rotunde cu diametrul de 4-6 µm colorate în roşu strălucitor cu un perete gros, iar în interior conţin elemente granulare cu aspect de bastonaş, dispuse periferic şi de culoare brun închis, fondul preparatului fiind verde. Uneori oochiştii apar complet necoloraţi, fără elemente de structură internă dar păstrându-şi dimensiunile şi forma sau cooexistă cu cei coloraţi. Această particu-laritate cromatică nu a fost explicată, dar prezenţa chiştilor necoloraţi este considerată drept argument de diagnostic în criptosporidiaza. Prin această coloraţie se pot evidenţia şi oochiştii de Isospora beli.



Cryptosporidium parvum



Isospora belli- oochist

Isospora belli- oochist

7.4 Preparatul permanent, colorat Giemsa se impune atunci când trofozoiţii sau chiştii nu pot fi identificaţi prin examen direct.
Execuţia frotiului: pe o lamă de sticlă port obiect se depune o picătură de SF iar cu o ansă metalică cu buclă se prelevă un fragment de materie fecală, se omogenizează şi se extinde frotiul în strat subţire şi uniform; se lasă să se usuce la temperatura camerei.

Coloraţia Giemsa:
Timpul I - fixarea frotiului cu alcool metilic – 30 secunde

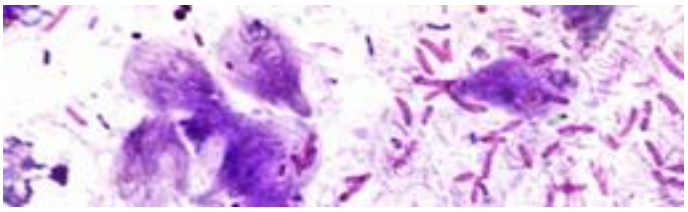
Timpul II - colorarea cu colorant Giemsa 5% - 20-30 minute

Spălare cu apă de robinet

Uscare în stativ
Examinare cu obiectiv de imersie. Se evidenţiază celulele colorate în violet

Frotiu necolorat pe lamă portobiect

Frotiu colorat



Coloraţie Giemsa

7.5 Examinarea în strat gros Kato- Miura

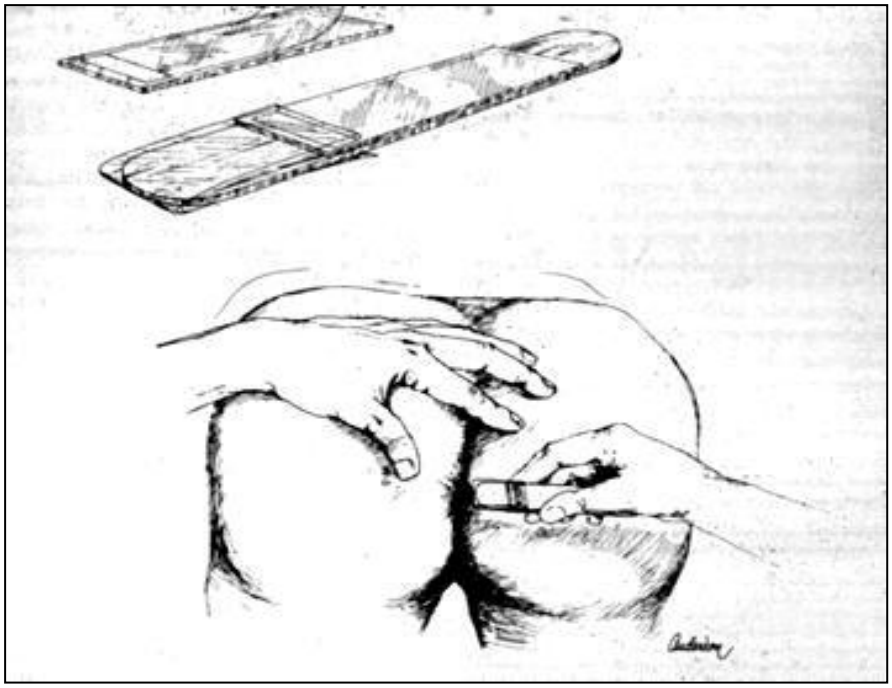
Prin această metodă se pot decela toate ouăle de helminţi cu precădere ouăle cu coajă groasă. Ouăle îşi păstrează caracteristicile morfologice şi metoda permite decelarea mai rapidă a acestora. Pe o lamă de sticlă se aşează o cantitate de materie fecală cât un bob de grâu, peste care se pun 1-2 picături de soluţie glicerol-verde malachit . se acoperă cu o lamelă de sticlă şi se presează uşor pentru a obţine un strat uniform şi plat. Se lasă la temperatura camerei câteva minute şi se examinează microscopic cu obiectiv 10x şi apoi 20x.

7.6 Examenul amprentei anale

Metoda permite evidenţierea ouălelor de Enterobius vermicularis depuse de parazit în pliurile mucoasei anale , precum şi ouăle de Taenia saginata eliberate din proglotele ce părăsesc activ tractul intestinal. Recoltarea se efectuează dimineaţa, înainte de efectuarea toaletei perineale sau a defecării. O bandă de scotch (bandă adezivă) transparentă de circa 10 cm. lungime se aşează peste capătul unei baghete de sticlă, cu partea lipicioasă în afară. Bolnavul este în picioare aplecat înainte , departându-şi fesele cu mâinile. Se introduce vârful baghetei peste care este aplicată banda adezivă în anus, câţiva milimetrii şi se apasă uşor pereţii, desfăcându-se pliurile

anale. Se aşează banda cu partea adezivă pe o lama de microscop.

Înainte de examinarea lamei se ridică un capăt al benzii şi se pune o picătură de ulei de imersie pentru a creşte transparenţa sau o picătură de Lugol pentru colorare, după care se lipeşte din nou banda pe lamă. Se examinează cu obiectiv 10x şi 40x.

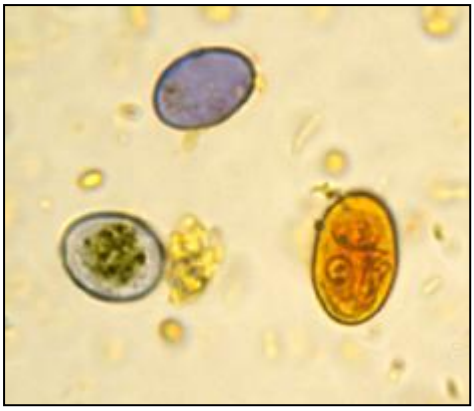


Tehnica amprentei anale

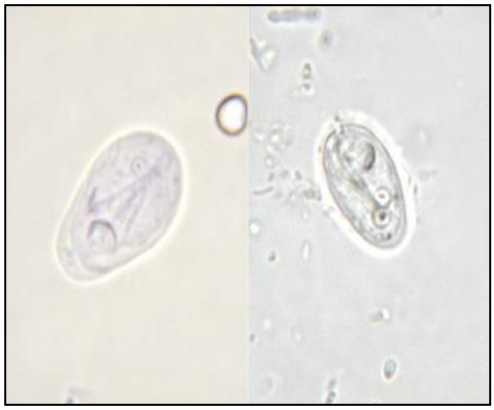
7.7 CARACTERE DE IDENTIFICARE

Giardia lamblia **(** ***Giardia intestinalis*****)** – agentul etiologic al giardiozei sau lambliazei, există sub formă de trofozoit sau chist.
Trofozoitul este piriform cu dimensiuni cuprinse între 10-12µ şi 5-7 µ. Are aspect de pară tăiată longitudinal, faţa plată reprezentând suprafaţa ventrală. Are doi nuclei situaţi anterior şi patru perechi de flageli care pornesc din corpusculii bazali, grupaţi în tetrade, între cei doi nuclei. Posterior se află o formaţiune ca o virgulă, corpusculul median. Trei dintre cele patru perechi de flageli părăsesc parazitul din zona anterioară, posterioară şi caudală a trofozoitului. Perechea a patra, flagelii ventrali sunt situaţi într-o depresiune spre porţiuneaextremitatea caudală a trofozoitului.Citoscheletul , un ansamblu de elemente filamentoase şi microtubuli, legaţi de corpusculii bazali din care iau naştere flagelii. Această structură formează o platformă cu un orificiu central acoperit numai de membrana plasmatică, şi care prezintă la marginea externă o creastă laterală ce se fixează pe mucoasa intestinală.
Trofozoitul este uşor vizibil în preparatul în SF, având mişcări de răsucire şi de torsiune. Chistul este ovoid sau elipsoid cu lungimea de 7-10 µ,cu un perete gros de 0,3-0,6 nm, compus dintr-un strat de fibrile dispuse într-o reţea, are 2-4 nuclei situaţi

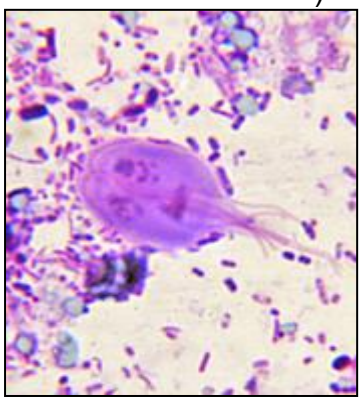
spre extremităţi, iar flagelii se văd ca structuri liniare alături de corpusculul median.



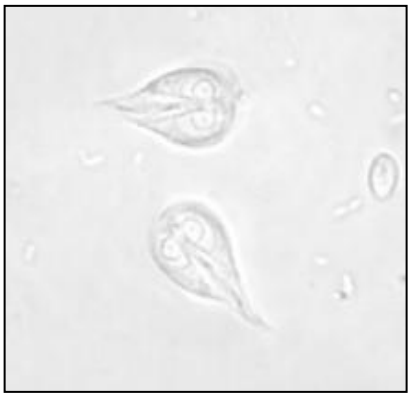
Chişti în Lugol (chişti cenuşii neviabili si un chist brun)



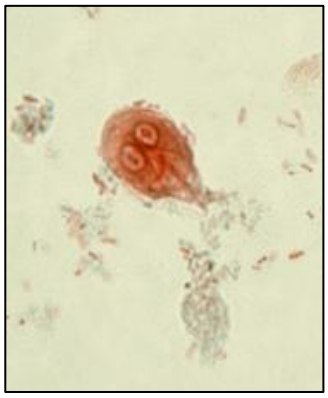
Chişti în SF



Trofozoit (frotiu Giemsa)

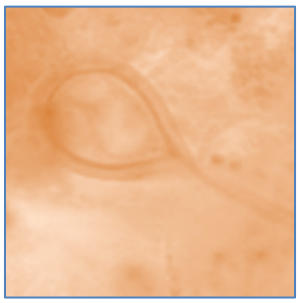


Trofozoiţi în SF



Trofozoit în Lugol

Artefacte: spori de ciuperci



Artefact ce imita trofozoitul

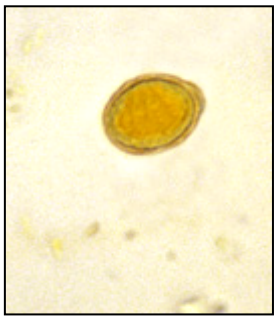
Mobilitatea este observabilă în preparatele native cu SF:

- *Giardia lamblia* prezintă mişcări lente de răsucire sau de torsiune, asemănătoare frunzelor ce cad toamna din copaci

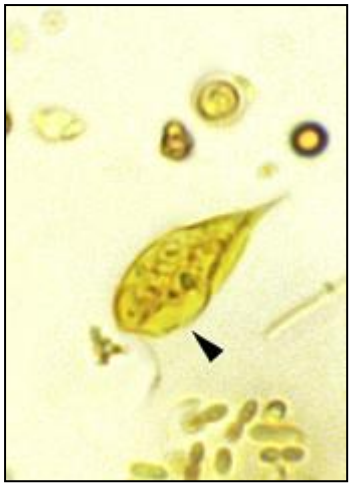
- *Trichomonas intestinalis* are mişcări sacadate, nervoase, mai rapide
- *Chilomastix mesnili* are mişcări rigide, rotative

Chilomastix mesnili considerat nepatogen parazitul poate fi găsit în scaunele diareice , şi mai recent au fost descrise cazuri de diarei cronice în care a fost găsit acest parazit. Trofozoitul trebuie diferentiat de Giardia lamblia, Trichomonas hominis, având trei flageli anteriori ,şant în spirală si nucleu unic, citostom şi absenţa membranei ondulante. Chistul are formă de lamâie si un singur nucleu.

Chişti *Chilomastix mesnili* (SF şi Lugol)



Artefact- Spor fungic

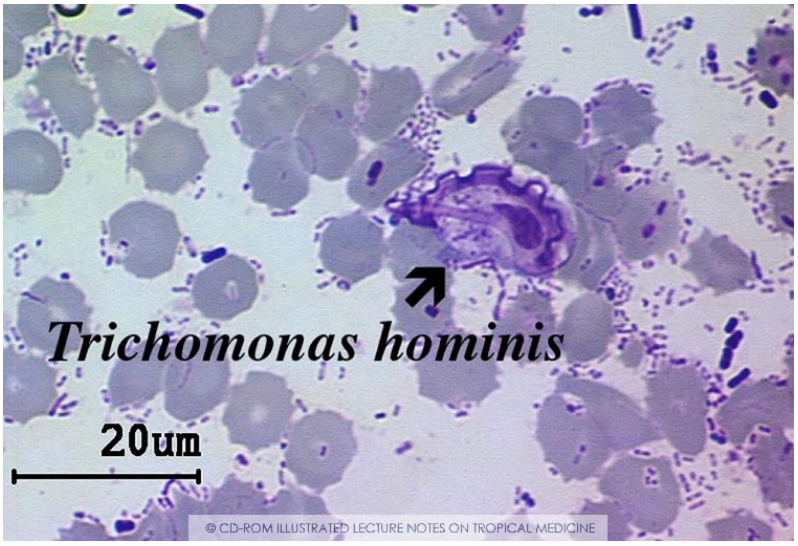


Trofozoit de *Chilomastix mesnili* (Lugol)

Trofozoit de *Chilomastix mesnili* iar jos chist Giardia (SF)

Trichomonas hominis – nu exista dovezi certe de patogenitate acestui parazit, care nu invadează mucoasa intestinală şi nu provoacă tulburari intestinale,dar se gaseste uneori in scaunele diareice. Se cunoaşte doar stadiul de trofozoit care trebuie diferenţiat de Giardia lamblia, Chilomastix mesnili, având:

- 3-5 flageli liberi în regiunea anterioară şi un flagel recurent pe marginea membranei ondulante, care în regiunea posterioară devine liber
- axostil semirigid cu extremitatea posterioară liberă
- costa existentă pe toata lungimea membranei ondulante
- nucleu ovoid
- în ser fiziologic se poate observa uşor, fiind foarte mobil datorită flagelilor care-i asigură înaintarea şi mişcările de rotaţie

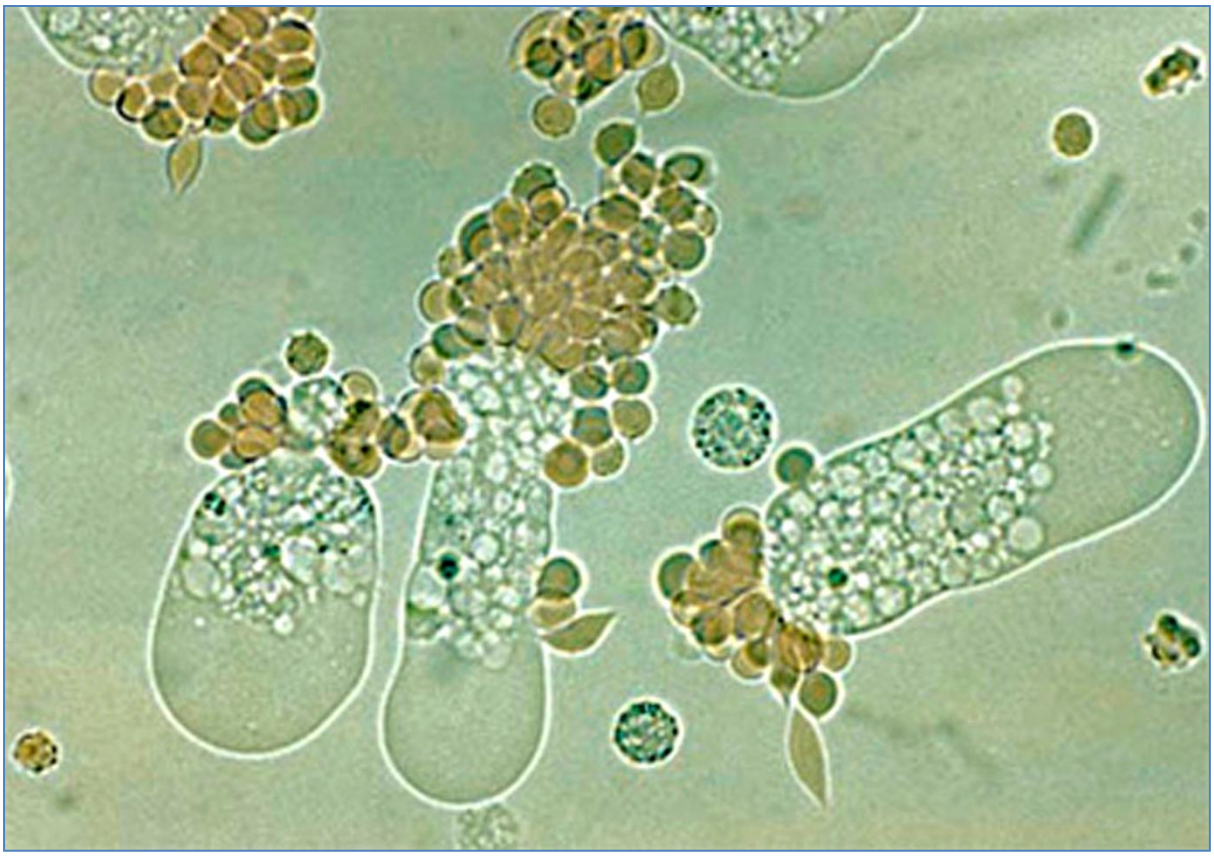


Frotiu coloratie Giemsa

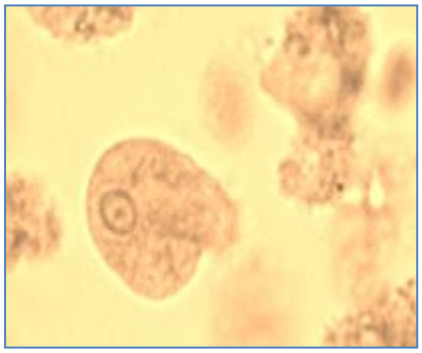
Entamoeba histolytica produce amibiaza sau dizenteria amibiană. Termenul de amibiază denotă condiţia de găzduire a protozoarului, fără sau cu manifestări clinice (dizenteria ambiană, colita nedizenteriformă, amibomul, ambioza intestinală complicată, colita postamibiană). Dizenteria amibiana este intâlnită în zona tropicală sau subtropicală; in zona temperată se intălneşte la persoane debilitate sau după corticoterapie prelungită; se instalează brusc cu dureri abdominale, tenesme şi scaune diareice numeroase 5-15 / zi conţin o cantitate mică de materii fecale păstoase sau lichide amestecate cu glere mucopurulente şi sânge, scaunele tipice sunt lipsite de materii fecale conţinând doar glere mucosanghinolente, descrise sub denumirea de “scuipat dizenteric”. Proba trebuie examinată la microscop imediat în soluţie salină pentru a surprinde trofozoizii hematofagi mobili. Adăugarea unui colorant vital (solutie de albastru metilen) accentuează detaliile morfologice, reducând posibilitatile de confuzie. Dacă examinarea nu se face imediat, proba se poate păstra câteva ore la +4ºC. În scaunele formate pot fi evidenţiaţi chiştii printr-un examen microscopic direct în ser fiziologic sau cu soluţie Lugol.

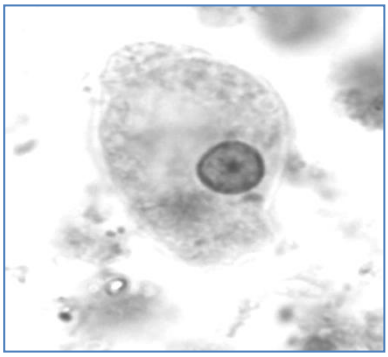
Trofozoidul are 20-30 μm diametru, contur neregulat. Emite pseudopode în formă de degete cu ajutorul cărora se mişcă în toate directiile. Contine o endoplasma fin granulata şi o ectoplasmă clară. Nucleul este sferic si este inconjurata de o membrana nucleara. In centrul nucleului se gaseste un singur cariozom inconjurat de un halou clar. Formele “minuta” sunt mai mici au 15-20μ, iar formele,,magna’’ ajung pâna la 30-40μ. Chistul are o citoplasma granulara si contine patru nuclei. Diagnosticul diferential trebuie facut fata de alte amibe intestinale considerate nepatogene.

Chisti *Entamoeba hstolytica*



Trofozoiti *Entamoeba hstolytica* si hematii intra si extracelular

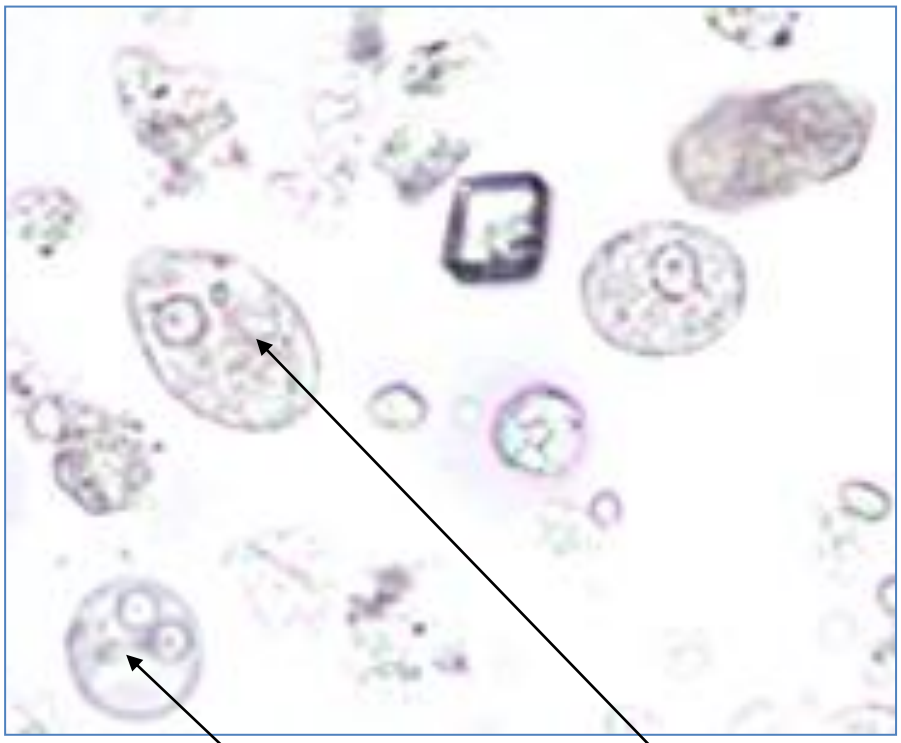




Lugol SF

Trofozoiti *Entamoeba histolytica*

Entamoeba hartmanni este o amiba nepatogena si se poate intalni frecvent in materiile fecale dar trebuie diferentiata de amibele patogene. Prezența acestuia indica consumul de apa sau alimente contaminate. Nu există nici o dovadă ca ar avea un potential patogen, chiar si în cazul imunodepresiei.

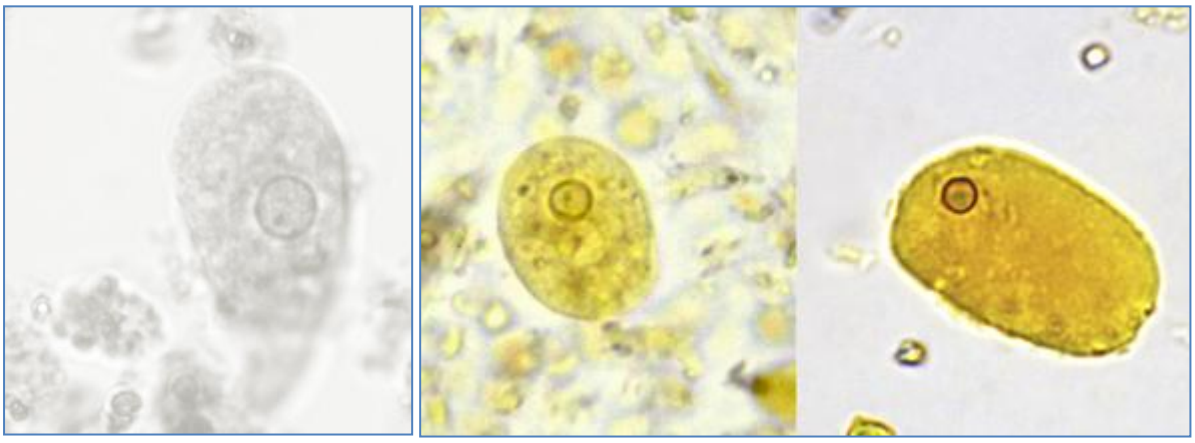


Entamoeba hartmanni

Entamoeba coli este amiba nepatogena dar a fost gasita frecvent in scaunele diareice si există şi părerea că în anumite împrejurări se comportă ca un agent patogen, provocând tulburări dispeptice. Trofozoitul are 20-30 μm, endoplasma granulară cu vacuole se mişcă lent emitând pseudopode scurte, granulare; nucleu vizibil pe preparate necolorate ca un inel de granule refractile, iar pe preparatele colorate are o membrana groasă. Chistul, sferic sau ovoid cu dimensiuni între 10-33 μm este mai mare decat chistul de Entamoeba histolytica; chistul imatur are 1-2 nuclei iar cel matur are in general 8 nuclei (rar 16 sau 32) înconjurati de o masă de glicogen are un perete puternic refractil.

Lugol SF Artefact- celula vegetala

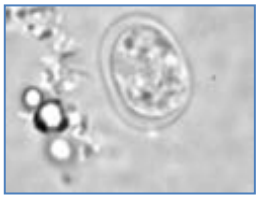
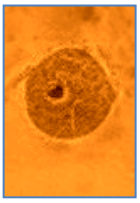
Chisti *Entamoeba coli*



SF Lugol Artefact

Trofozoiti *Entamoeba coli*

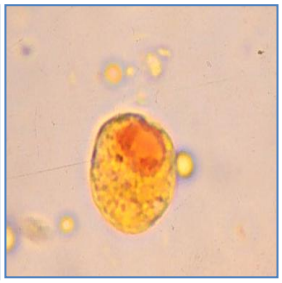
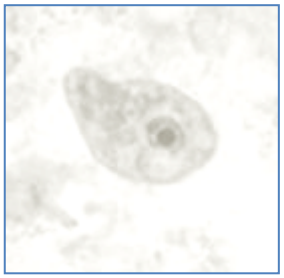
Endolimax nana este nepatogen dar prezenta lui indica ingestia unui material poluat

Lugol SF

Chisti de *Endolimax nana* Trofozoit

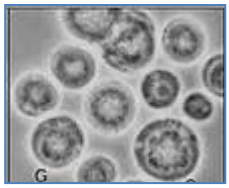
Iodamoeba buetschilii este nepatogen dar sunt citate cazuri rare in care s-a constatat patogenitatea acestei amibe. Se diferentiaza de celelalte amibe prin caracteristicile nucleului si masa compacta de glicogen.

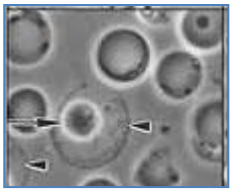
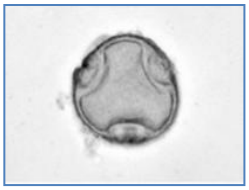



Chisti (Lugol) Trofozoit (SF) Trofozoit frotiu

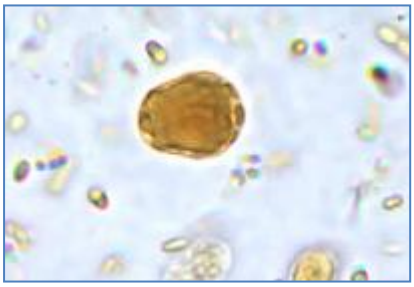
Blastocystis hominis este agentul etiologic al blastocistozei care localizat în intestinul gros poate determina pe cale toxică sau alergică tulburari de tranzit intestinal (diaree).Organism cu o apartenenţă incertă se prezintă sub patru forme:

- forma vacuolară este forma comună, caracterizată printr-o vacuolă centrală înconjurată de o citoplasma fină cu mai mulţi nuclei
- forma, similară ca aspect cu cea precedentă se caracterizează prin prezenţa a numeroase granule în vacuolă şi în citoplasmă
- forma amoebidală se intâlneşte în boala simptomatică, are forma neregulată şi emite pseudopode
- forma chistică de dimensiuni mai mici, are un perete chistic mai gros cu mai multe straturi, nu are vacuolă centrală ci doar câţiva nuclei

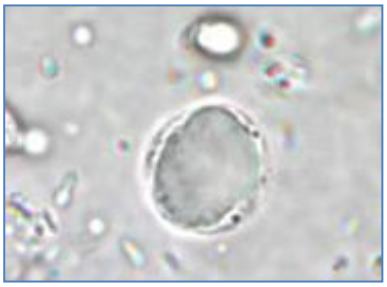


Forma amoebidala Forma vacuolara Forma granulara Forma chistica Artefact



Lugol

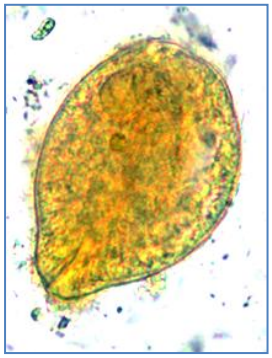


SF

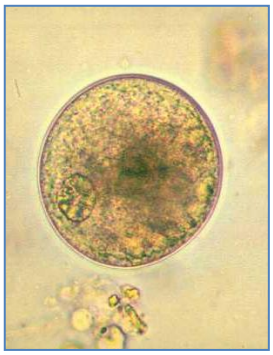
Chisti *Blastocystis hominis*

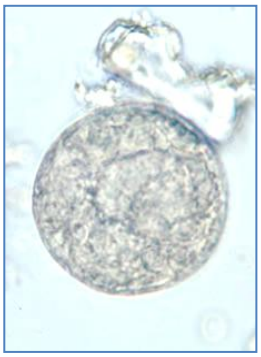
Balantidium coli este agentul etiologic al balantidiozei (dizenteria balantidiana), este cel mai mare ciliat întâlnit la om şi se prezintă sub forma de trofozoit şi sub formă de chist.

Trofozoiti (Lugol)



Chist(Lugol)





Chist (SF)

Balantidium coli

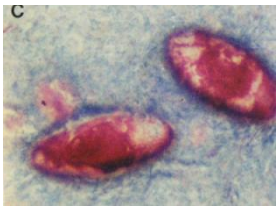
Trofozoitul are formă ovoidală, cu regiunea anterioara uşor îngustată urmat de un strat extern protector sub care se gaseste o zonă îngustă de ectoplasmă; are suprafaţa acoperită de cili lungi, vizibili mobili în ser fiziologic ce-i imprimă mişcări de rotaţie - anterior are o depresiune cu aspect de tunel -peristomul care comunică cu citostom şi cu un citofaringe, iar la polul opus are un mic orificiu –citopige; are în citoplasmă o vacuolă contractilă mare în apropiere de citopige şi alta în zona centrală, numeroase vacuole digestive, o masă mare reniformă de cromatină-macronucleul şi un nucleu mai mic în vecinataea acestuia. Chistul este rotund ovoidal cu un perete gros refractil, poate prezenta cili la cei de curând inchistaţi.

Cryptosporidium parvum Este agentul etiologic al criptosporidiozei cu doua forme clinice, BDA de scurtă durată care se vindecă spontan la persoane imunocompetente, şi o forma gravă cu diaree de lungă durată ce pune în pericol ţa , la persoanele cu deficienţă imună. Se prezintă sub formă de trofozoit (forma vegetativă) şi sub formă de oochist (forma de rezistenţă).Trofozoitul se identifică rar în scaune, cel mai frecvent se obdervă oochiştii care au un perete gros şi patru

sporozoiţi. În preparatele native în ser fiziologic mai ales, ceea ce atrage atenţia sunt formaţiunile rotunde cu dublu contur ce delimitează un perete gros.

Isospora beli este agentul etiologic al isosporozei (coccidioza intestinală), care îmbracă doua forme clinice ; la persoanele normale imunologic, se manifestă ca o enterocolită cu durată de 7-10 zile, însoţită de febră, adinamie, astenie, colici abdominale cu vindecare spontană ; la bolnavii cu deficienţe imunitare (SIDA), diareea este trenantă cu febră şi malabsorbţie secundară ; uneori diareea cu Isospora beli singură sau asociata cu Cryptosporidium reprezintă manifestarea de debut al sindromului de imunodeficienţă dobândit.

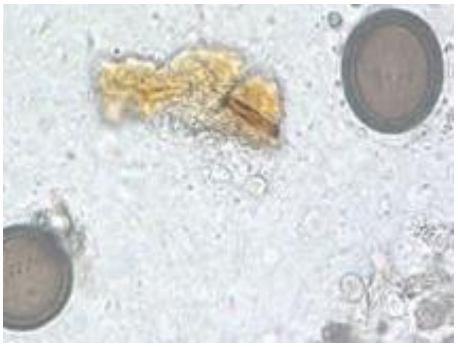
Oochisti (Lugol)



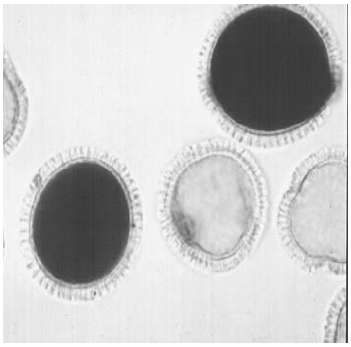
Oochisti frotiu Ziehl-Neelsen modificat

Artefact

Taenia spp. Agentii etiologici ai teniazelor in arealul nostru geografic sunt Taenia solium si Taenia saginata.



Oua(Lugol)



Artefact

Examenul coproparazitologic constă în examinarea materiilor fecale şi a paraziţilor (proglote + scolexul) eliminaţi odată cu materiile fecale sau independent.
Ouale se evidenţiază în materiile fecale prin examen microscopic direct şi prin tehnica de examinare "in strat gros" Kato şi Miura. Intre oualele de Taenia solium şi Taenia saginata nu sunt diferenţe şi caracteristic se observa cele 6 cârlige, şi invelişul gros striat.

Examinarea proglotelor de tenie :

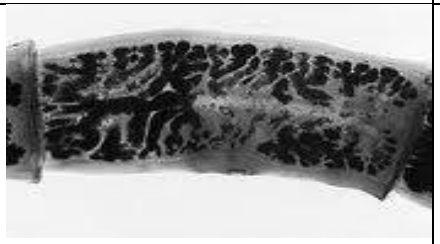
- Proglotele de tenie găsite în scaun se vor spăla în soluţie salină fiziologică, apoi se vor plasa între doua lame microscopice, care sunt separate la extremitaţi prin două bucaţi de carton.

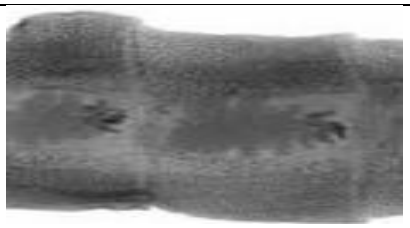
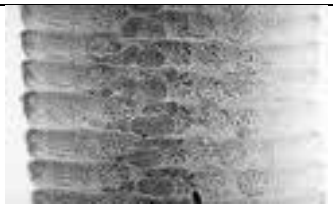
- Preparatul se va fixa apoi cu două benzi de cauciuc la cele doua capete pentru ca proglotul să rămână orizontal. În acest fel ramurile uterine vor devenii vizibile la examinarea microscopică. Scolexul de Tenia solium este globulos are patru ventuze puternice şi un rostrum retractil prevăzut cu o coroană dublă de cârlige (aproximativ 25-30) .Proglotele sunt diferite în funcţie de vârstă ; astfel cele tinere (mai apropiate de scolex) sunt mai late decât lungi, iar cele mature sunt pătrate. Proglotele ovigere (batrâne) care se elimină, sunt mai lungi decât late, astfel laţimea este cuprinsâ în lungime de 2,5-3 ori. Uterul gravid ocupă cea mai mare parte a proglotului oviger, prezintă ramificaţii dendritice de obicei 9 (maxim 13) de fiecare parte. Proglotele se elimină una câte una sau înlanţuite şi numai odată cu scaunul fecal.

- In proglotul oviger se pot găsi ouă , aproximativ 800000.

Ouale ajung în scaun numai dacă se sparg proglotele. De aceea examenul coproparazitologic se va repeta de câteva ori. Se poate folosi si tehnica amprentei anale (metoda benzii adezive) deoarece o parte di noua raman in pliurile anale.

Caractere diferentiale

Specie	Scolex	Proglot(e)	Ou
Taenia solium			
Taenia saginata			

Diphyllobothrium latum			
Hymenolepis nana			
Hymenolepis diminuta			

Tenia saginata are scolexul mai mare decât cel al teniei soliium. Este prevăzut cu patru ventuze fară rostrum cu cârlige.
Proglotele prezintă mişcări active (au musculatura puternică) astfel încât se elimină individual şi între scaune.
Proglotele ovigere sunt mai lungi ca la Tenia solium, laţimea lor fiind cuprinsă în lungime de aproximativ 5 ori. Uterul are ramificaţii dicotomice, de obicei mai mult de 18, şi conţin un număr mare de ouă (100 000)ce nu pot fi deosebite de cele ale Teniei solium.
Ouale au un diametru de 30-40µ şi conţin un embrion de hexacant. Eliminarea lor nu depinde neapărat de dezintegrarea proglotului, ci are loc din primele momente de după desprinderea de strobil. Prin marginea anterioară a proglotului, adiacent strobilului iese un lichid lăptos plin cu ouă.
Ouale se evidenţiază în materiile fecale prin examen microscopic direct şi prin tehnica în strat gros Kato şi Miura

Diagnosticul diferenţial între *Tenia saginata* şi *Tenia solium* :

- La *Taenia solium* :

-eliminarea proglotelor are loc numai odată cu scaunul fecal, câte una sau în lanţuri de câteva proglote.

-proglotele eliminate sunt de 2,5-3 ori mai lungi decât late.

-prin transparenţă se pot vedea ramificaţiile uterine dendritice în medie câte 9 de fiecare parte

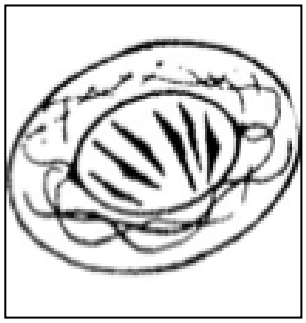
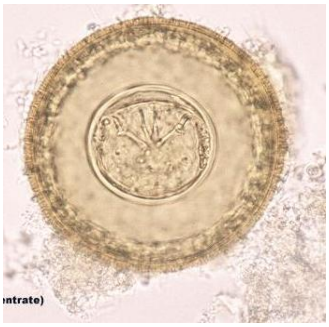
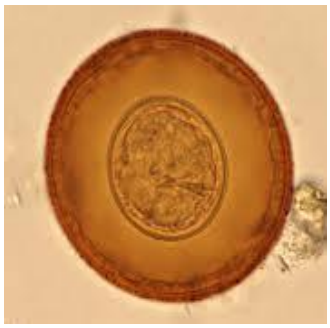
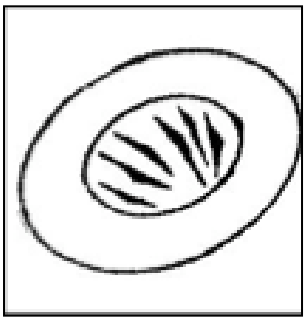
- La *Taenia saginata* :

-eliminarea proglotelor se face activ şi între scaune.

-proglotele sunt de 5 ori mai lungi decăt late.

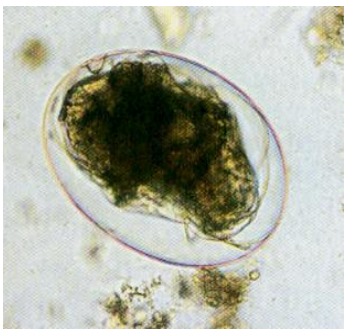
-prin transparenţă se observă uterul care se ramifică dichotomic (ramificaţii secundare), având de obicei mai mult de 18 ramificaţii.

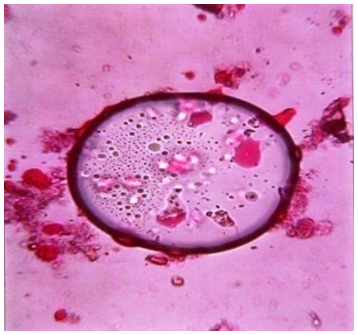
Hymenolepis spp. Hymenolepis nana şi Hymenolepis diminuta, sunt agenţii etiologici ai himenolepidozei diagnosticul se stabileşte prin examen coprologic prin examinari repetate.

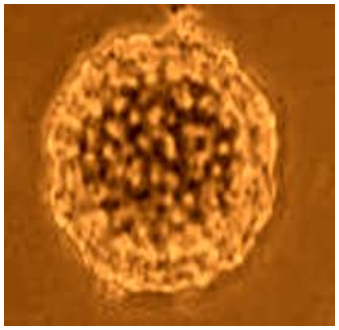





Ouă de *Hymenolepis nana* (sus) şi *Hymenolepis diminuta* (jos)- în SF şi Lugol

Diagnosticul pozitiv se stabileşte prin evidenţierea ouălor în materii fecale. Diagnosticul diferenţial între cele două cestode se bazează pe diferenţele morfologice ale ouălor (prezenţa sau absenţa filamentelor polare), ouăle pot fi confundate cu:

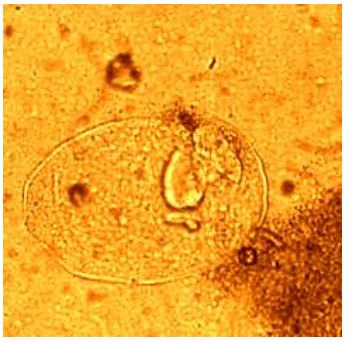

Ou de acarian


Bulă de mucus


Celulă vegetală

Polen

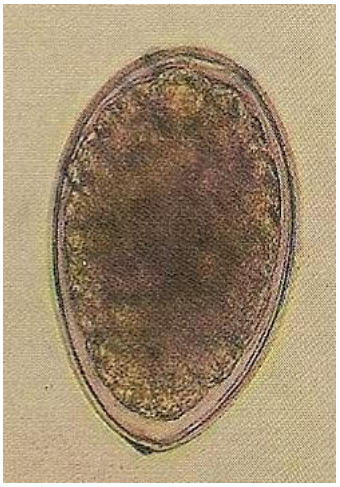
Artefact



Celulă vegetală

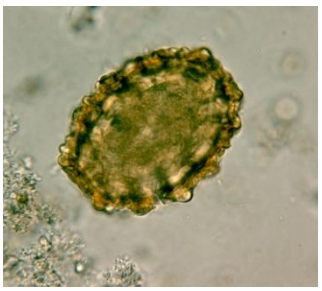
Diphylobothrium latum *(Taenia lata, Botriocephalus latus)* este agentul etiologic al botriocefalozei. Diagnosticul parazitologic se realizeaza prin evidentierea oualelor in materiile fecale.Proglotele se dezintegreaza usor in lumenul intestinal, de aceea nu pot fi observate.

Oua in SF (sus), Lugol (stanga jos) si artefact- celula vegetala (dreapta jos)



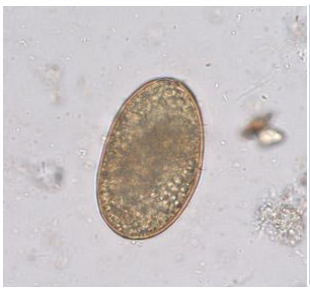
Are o lungime de 3-15 m , creşte cu 5 cm pe zi, are peste 4000 de proglote , cele adulte au uterul neramificat şi comunică cu exteriorul printr-un orificiu numit tocostom. De aceea ouăle sunt prezente in mod constant , în număr mare, în materiile fecale, ceea ce permite diagnosticul prin examen coproparazitologic. Ouăle sunt ovalare de 70/45µm, au culoare brună, la polul anterior prezintă un opercul(căpăcel), iar la polul opus , carena (pinten). În interior conţin zigotul. Nu sunt embrionate la eliminare, ele embrionează în mediu acvatic.

Ascaris lumbricoides (*Ascaris suum*) este cel mai mare nematod care parazitează omul. Este alungit, cilindric, cu extremităţi conice. Asemănător râmei de grădină, are sexe separate. Oul fecundat este sferic sau uşor ovalar măsurând 65-75/30-50 µm având la exterior un înveliş albuminos, mamelonat sub care se găseşte un strat gros incolor, relativ gros, neted, apoi o membrană internă subţire, impermeabilă.Acestea adăpostesc în interior celula ou rotundă, care umple complet oul, lăsând un spaţiu liber la extremităţi. Oul fertil este eliminat în stadiu unicelular. Are culoare brună. Oul nefertil (în lipsa masculului femela depune ouă nefertile) este mai alungit şi în interior conţine o masă dezorganizată de granule ce umplu complet oul. Are culoare brună. Trebuie diferenţiaţi de artefacte ca amidonul nedigerat, celule vegetale, ouă de acarieni, etc.



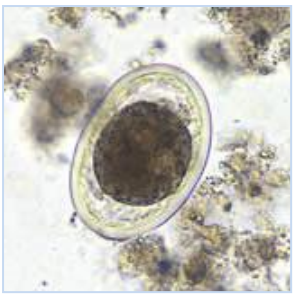
Ou fertil

Ou infertil



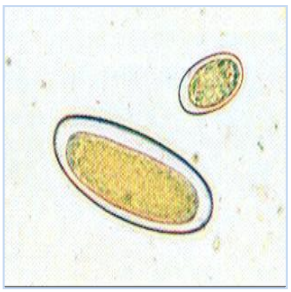
Ou infertil decorticat

Ou embrionat

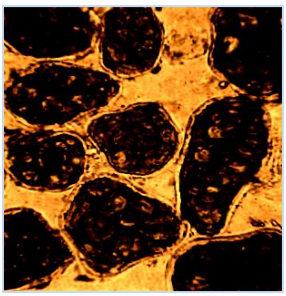


Ou fertil decorticat

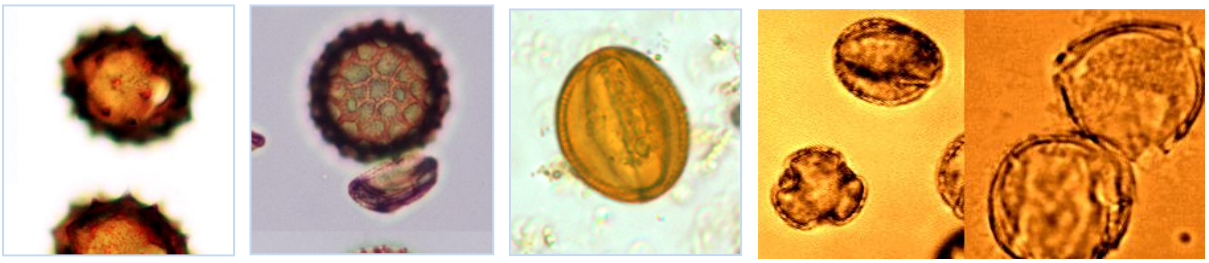
Ou de acarian



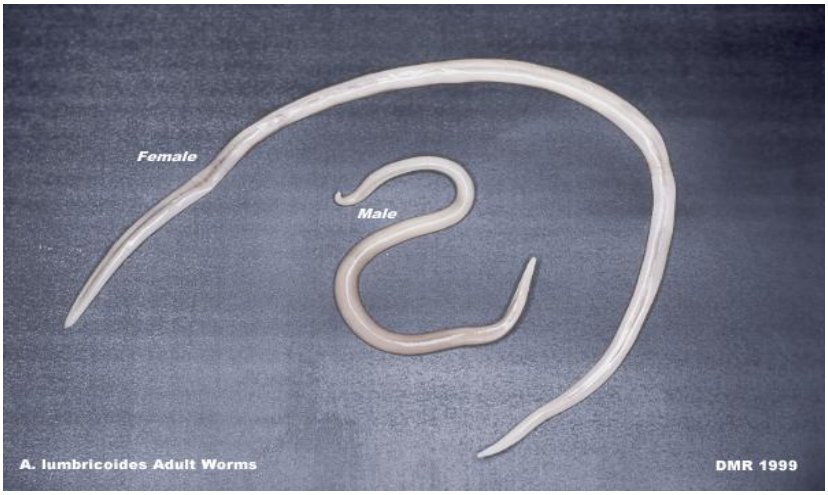
Spor vegetal



Amidon nedigerat



Polenuri

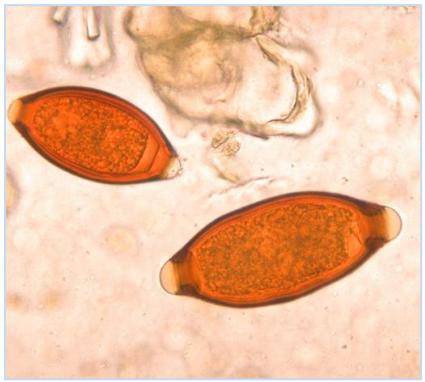


Ascaris lumbricoides

Trichuris trichiura este agentul etiologic al trichocefalozei sau trichurozei. Parazitul are formă de bici, cu o porţiune anterioară efilată care reprezintă 3/5 din lungimea totală şi o porţiune posterioară îngroşată. Masculul măsoară 3-4 cm lungime şi are extremitatea posterioară curbată ventral într-o buclă de 360°, iar femela are până la 5 cm, extremitatea posterioară este dreaptă şi se termină cu un vârf obtuz.

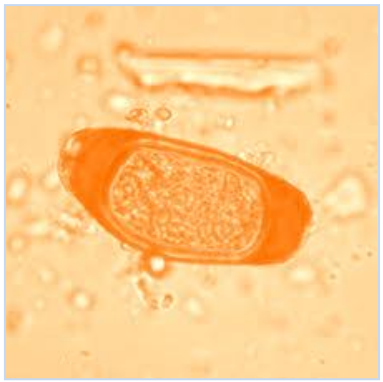
Trichuris trichiura
(în dreapta femelă, în stanga mascul)

Oul este ovalar are 50/25µm şi au o culoare galben-brună. Coaja groasă este întreruptă la cei doi poli, unde se găsesc 2 formaţiuni proieminente albe, ca nişte dopuri, compuse din microfibrile mucoide. În interior se găseşte un alt înveliş subţire, transparent care acoperă celula nesegmentată. Oul nu este infectant în momentul eliminării din organism.



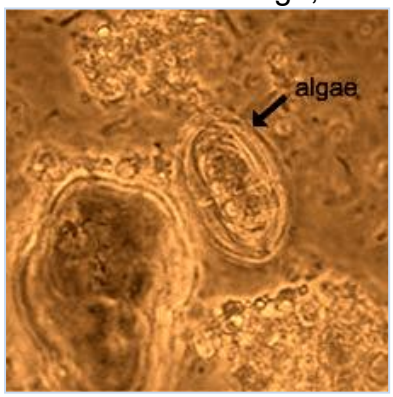
Ouă (Lugol)

Ou (SF)

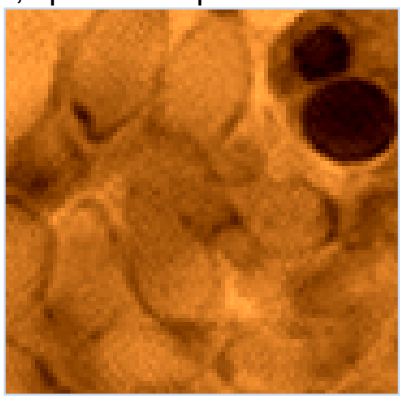


Ou atipic(Lugol)

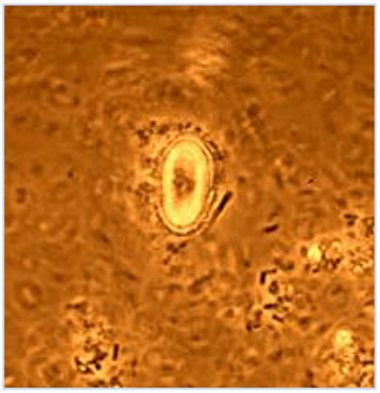
Surse de eroare: alge, conidii, spori de ciuperci comestibile.



Algă



Conidii



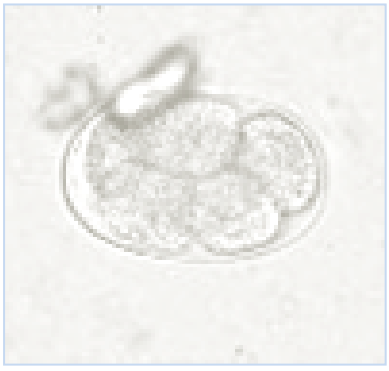
Spor de ciupercă Comestibilă

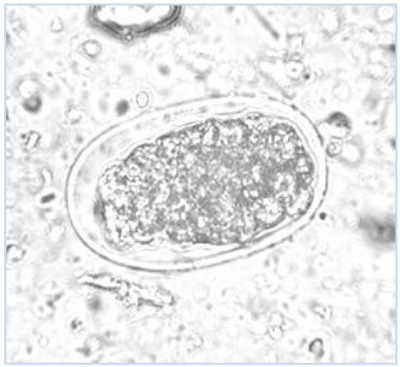
Ancylostoma duodenale (Hookworm –„ vierme cu cârlig”este un nematod mic: masculul măsoară 8-10 mm / 0,4 -0,5 mm, iar femela 10-13 mm/ 0,6 mm grosime. Corpul se subţiază anterior şi se termină cu capsula bucală cu aspect de ventuză cu pereţi chitinoşi, în care se deschide orificiul bucal. Capul este curbat uşor dorsal. La extremitatea posterioară masculul prezintă o formaţiune cu aspect de umbrelă, punga copulatoare, unde se deschide orificiul cloacal din care ies doi spiculi genitali lungi.

Femelă

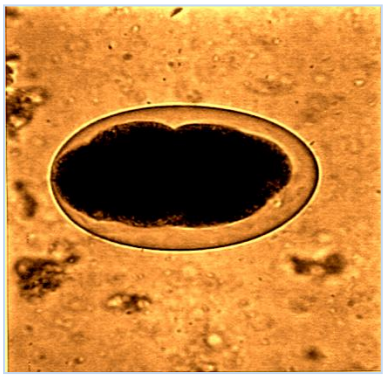
Mascul

Larvele prezintă termotropism şi higrotropism (tendinţa de a se orienta spre căldură şi umezeală, geotropism negativ (tendinţa de a se ridica pe un suport umed) şi histotropism fiind atrase de ţesuturile animale. Datorită acestor tropisme , larvele pătrund prin tegumente intacte, ce vin în contact cu solul poluat cu larve. Oul are formă ovalară cu dimensiuni 60/40 µm este transparent cu un înveliş neted şi subţire, iar în interior are 2-4 blastomere..



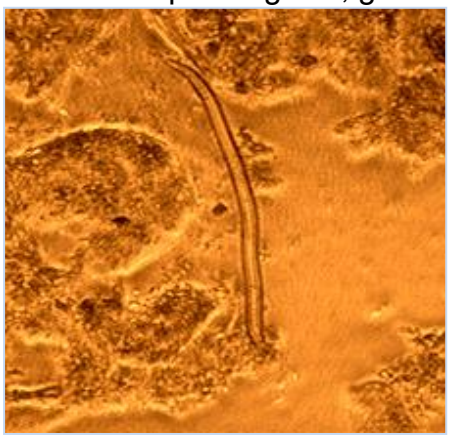


Ouă de *Ancylostoma duodenale* (în SF)



Ouă de *Ancylostoma duodenale* (Lugol)

Surse de eroare: peri vegetali, granule de polen, celule vegetale.



Păr vegetal

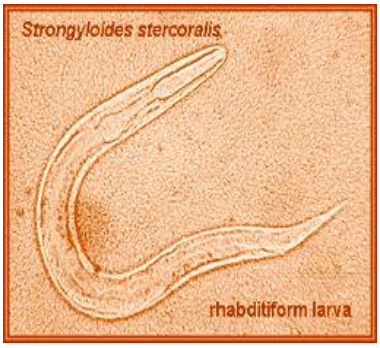
Celule vegetale

Păr vegetal

Polen

Larvele pot fi surprinse în preparatele native în SF şi sunt mobile.

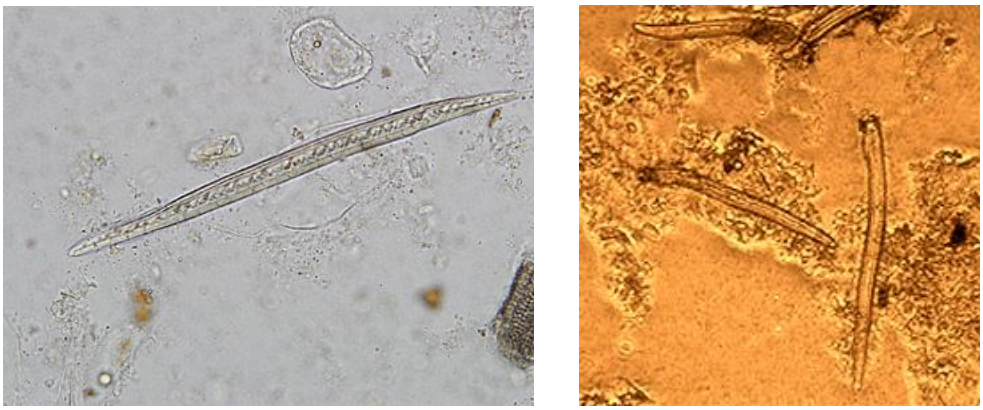
Strongyloides stercoralis (*Anguillula stercoralis*) este agentul etiologic al strongiloidozei sau diareei de Cochinchina. Este aesmănător cu *Ancylostoma duodenale*. Femela are 2 mm iar masculul 750µm. Extremitatea anterioară este efilată, terminându-se cu o cavitate bucală scurtă cu patru buze mici. Extremitatea posterioară se termină cu o coadă conică scurtă. Orificiul de pontă este situat subterminal şi ventral. Cavitatea bucală se continuă cu un esofag lung, cilindric şi un intestin care se deschide prin anusul subterminal. Aparatul reproducător este reprezentat prin organe pereche care diverg anterior şi posterior orificiului vulvar. Uterul conţine câteva ouă (8-12), ovalare cu înveliş subţire şi transparent cu dimensiuni de 30/50µm. Larvele sunt de două tipuri: rabditoide (mici, cu capsulă bucală scurtă şi un esofag alcătuit din două părţi cu o parte anterioară alungită, cilindrică separată printr-o strangulaţie de partea posterioară cu aspect bulbar) şi strongiloide, filariforme, subţiri foarte mobile, cu un esofag foarte lung uniform calibrat, ocupând aproape jumătate din lungimea larvei. Femela depune în jur de 40 de ouă care greu pot fi depistate în materiile fecale, deoarece dau naştere la larve ce eclozează repede, după ce au fost depuse. Larvele , în SF sunt vizibile şi au mişcări vii, sinuoase de anghilă.



Larve rabditoide

Larve strongiloide

Ouă embrionate
Surse de eoare pot fi perii vegetali, oua de acarieni, etc.



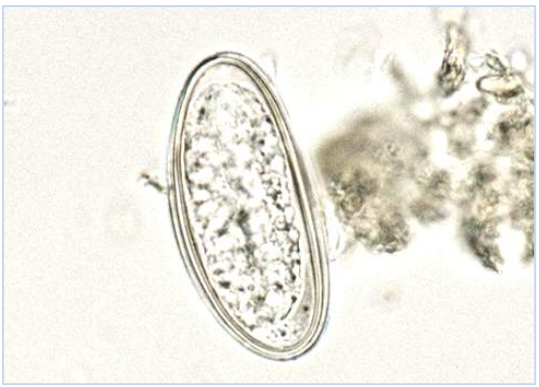
Artefacte (peri vegetali)

Enterobius vermicularis (Oxiuris vermicularis) este agentul etiologic al oxiurzei sau enterobiozei. Este un nematod mic, alb – gălbui, cu extremitatea anterioară înconjurată de o expansiune cuticulară, în care pătrunde lichidul perienteric, realizând o formaţiune veziculară, denumită buton cefalic, cu rolul de afixa parazitul de mucoasa intestinală. Aparatul digestiv este compus dintr-un esofag rabditoid, intestin şi rect. La femelă aparatul reproducător este dublu de tip tubular, fiind compus din câte un ovar şi un uter anterior şi altul posterior. Femela are 8-13 mm lungime şi 0,3-0,5 mm grosime, extremitatea posterioară este subţire şi ascuţită. Masculul este mai mic şi are extremitatea posterioară curbată anterior. Oul are formă ovalară, asimetrică, cu o latură plană şi una convexă. Are 50-55µm /30-32µm, este transparent şi are un înveliş subţire dublu, iar in interior are un embrion giriniform, cu un corp ovoid şi o prelungire ca o coadă.

Oxiur (mascul)

Oxiur (femelă)

. Ou embrionat (Lugol)



Ou embrionat(SF)

7.8 EXPRIMARE REZULTATE

Rezultatul examenului coproparazitologic trebuie sa mentioneze prezenta parazitului (adult , oua, chisturi, larve) cat si abundenta lui. Pentru protozoare rezultatul trebuie sa precizeze specia, genul si stadiul sau evolutiv (forma vegetativa, chistica) ca si tehnica de identificare (direct, concentrare).

Cand se deceleaza un parazit, rezultatul se formuleaza:

“Prezent/prezenti numeroase/numerosi sau rari/rare.....”

Cand nu se deceleaza nici un o structura parazitara, rezultatul se formuleaza:

“Absente structuri parazitare”

7.9 ELIMINAREA DESEURILOR

Dupa incheierea procesului analitic, probele care nu mai sunt necesare analizei se indeparteaza in conformitate cu reglementarile privind gestionarea deseurilor medicale.Gestionarea deseurilor medicale se realizeaza conform procedurii operationale POL-01 : «Norme de curatenie, dezinfectia si eliminarea deseurilor infectioase »

8.0 VALIDAREA REZULTATELOR

Specialistii din laborator care efectueaza analize sunt responsabili pentru validarea analitica a rezultatelor prin: respecatrea procedurilor de lucru, efectuarea controlului intern de calitate, introducerea datelor in sistemul informatizat al laboratorului. Buletinele de analiza sunt semnate si parafate de catre responsabilii cu efectuarea analizelor din compartimentele functionale ale laboratorului. Verificarea si autorizarea buletinului de analiza intra in responsabilitatea medicului sef de laborator. In aceasta etapa seful de laborator are autoritatea si responsabilitatea sa verifice sistematic rezultatele analizelor.

8.2 EDITAREA REZULTATELOR

Rezultatele analizelor se comunica beneficiarilor prin intermediul buletinelor de analiza. Formatul buletinelor este astfel proiectat incat sa se poata adapta diferitelor tipuri de analize efectuate si sa inlature posibilitatea de neintelegere sau utilizare gresita. Se realizeaza de catre responsabilul de analiza care semneaza si parafeaza buletinul.

8.3 COMUNICAREA REZULTATELOR

Buletinele se inmaneaza de regula direct clientului sau delegatului acestuia cu respectarea cerintelor de asigurare a confidentialitatii, de catre personalul de la sectorul de receptie. Clientul sau delegatul acestuia semneaza la primirea buletinului in Registrul de eliberare buletine /rezultate, cod RGL-5.8-01. In situatia in care valorile rezultatelor se afla intr-o zona critica, de alarma, managementul laboratorului procedeaza la comunicari ocazionale cu clinicienii prin telefon, astfel. Se pastreaza inregistrari ale comunicarilor realizate ca si rezultatele analizei. Buletinele de analiza sunt pastrate la sediul laboratorului timp de 7 zile dupa care cele neridicate sunt transmise clinicienilor care au efectuat trimiterea.

8.4 VALORI BIOLOGICE DE REFERINTA

In mod normal sunt absente structurile parazitare apartinand unor paraziti recunoscuti ca fiind patogeni. Prin urmare : ‘’Absente structuri parazitare’’ exprima statusul normal al tractului digestiv.

8.5 CONTOLUL DE CALITATE

Controlul de calitate se bazeaza pe compararea cu imagini din atlase si manuale, ca si examinarea preparatelor de catre specialisti diferiti din cadrul laboratorului sau din alte laboratoare, pentru a obtine a doua sau a treia opinie.

9.0 SURSE DE EROARE

- proba biologica fara mediu de transport (dezintegrarea trofozoizilor si moartea larvelor)

-etichetare gresita a probei sau inregistrare incorecta in Registrul de comenzi interne/ Registrul de analiza –rezultatul analizei se comunica pentru alt pacient.

-eroare de interpretare a imaginilor, corectabile prin comparari interpersonale si bilaterale intre intre laboratoare

10. RESPONSABILITATI

Seful de laborator

- Primeste comanda, contractul sau oferta pentru determinari.in cazul beneficiarilor externi
- Nominalizeaza responsabilul de analiza.
- Informeaza in scris factorii respunzatori atunci cand se constata neconformitati, solicitand remedieri.
- Valideaza rezultatul analizei.

Responsabilul de analiza

- Executa si supravegheaza analiza, conform procedurii specifice.
- Elibereaza rezultatul si il inregistreaza.
- Supervizeaza analizele executate de asistenti.
- Verifica periodic executantii de analiza.
- Confirma rezultatele analizei, prin semnarea si parafarea buletinului de analiza.

Asistentul de laborator

- Inregistreaza proba in registrul de evidenta a analizelor
- Executa analizele conform regulilor de procedura si standarde.
- Inregistreaza rezultatele intermediare, in registrul de lucru al
- compartimentului.
- Comunica observatiile cu privire la comportarea probei de analizat.
- Asigura reactivii de lucru

10. INREGISTRARI

Inregistrarile care fac obiectul acestei proceduri sunt :

- Registrul de comenzi interne/externe –pentru probele acceptate 4.4. - 01 I E
- Registrul de comenzi respinse- pentru probele necorespunzatoare RGL 4.4- 02
- Registrul de analize RGL – 4.4 – 01 I - MATERII FECALE
- Buletin de analiza FGL- 5.8 - 01

Spitalul Clinic de Boli Infecţioase
”Sf.Parascheva„ Iaşi
Laboratorul de analize medicale
IASI, Str.Octav Botez Nr 2

PROCEDURA SPECIFICA

COPROCULTURA

COD: PSL – M2 – 02

Editia 1, Revizia 0
Din data de 01.05.2013

APROBAT
Manager tehnic
Rodica Fântânaru

VERIFICAT
Responsabil calitate
As. Lorena Zaborila

Elaborat:
Responsabil analiza
Dr. Rodica Fântânaru

DIFUZAT IN REGIM CONTROLAT
EXEMPLAR Nr.

Avertisment : Documentul de fata este proprietatea Spitalului Clinic de Boli Infecţioase ”Sf.Parascheva„ Iaşi Laboratorul de analize medicale. Reproducerea si difuzarea documentului sunt in exclusivitate dreptul laboratorului

LISTA DE DIFUZARE / RETRAGERE

Locul difuzării	Primit				Retras			
	Nr. ex.	Data	Nume	Semnătură	Nr. ex.	Data	Nume	Semnătură
RC	0.	01.05.2013	As.Lorena Zaborila					
Manager Tehnic	1.	01.05.2013	Dr. Rodica Fântânaru					
Sef Compartiment	2.	01.05.2013	Dr. Rodica Fântânaru					
Responsabil analiza	3.	01.05.2013	Dr. Rodica Fântânaru					

INDICATORUL REVIZIILOR

Nr. Crt	Data	Editia/ revizia	Identificari modificare Capitol, subcapitol, pagina modificata, continut modificari	Functia si semnatura		
				Elaborat	Verificat	Aprobat

0. CUPRINS

CAPITOLUL

0 Scop

1 Domeniu de aplicare

2 Documente de referinţă

3 Definiţii şi abrevieri

4 Descrierea activitatii

5 Procedura de lucru

6 Controlul de calitate

7 Comunicare rezultate si valori de referinta

8 Surse de eroare

9 Responsabilitati

10 Inregistrări

1. SCOP ŞI DOMENIU DE APLICARE

Procedura descrie activităţile şi etapele, din Compartimentul de Microbiologie 2 (produse patologice din situusuri normal contaminate) privind prelucrarea MF în scopul stabilirii diagnosticului etiologic în sindromul diareic acut şi în TIA.
Procedura se aplică în cadrul Compartimentul de Microbiologie 2 al Laboratorului

2. DOCUMENTE DE REFERINŢĂ

2.1. Manualul Calităţii Laboratorului, cod MCL-01,
2.2. SR EN ISO/CEI: 15189: 2007 - Laboratoare medicale. Cerinţe particulare pentru calitate şi competenţă
2.3. SR EN ISO/TR 22869 - Laboratoare medicale. Ghid pentru implementarea în laboratoare a ISO 15189 : 2003
2.4. SR EN ISO 15190 : 2005 - Laboratoare medicale. Cerinţe pentru securitate.
2.5. IC-03 Controlul de calitate în microbiologie
2.6. Ministerul Sănătăţii – Academia de Ştiinţe Medicale – Metode curente pentru analize de laborator clinic, Ed. medicală, Bucureşti, 1982
2.7. *Coprologie clinica*, Ed. Medicala, Bucuresti, 1974, I. Gherman
2.8. D. Buiuc, M. Neguţ, *Tratat de microbiologie medicală*, Editura Medicală, Bucureşti, 1999
2.9. *Microbiologie clinică* vol I, Ed. Didactică şi Pedagogică, RA Bucureşti 1998, D. Buiuc
2.10. *Metode de laborator vol II*, Academia de ştiinţe medicale, Comisia de Standardizare, Ed. Medicală, Bucureşti 1997
2.11. Manualul de recoltare a produselor biologice, cod:PGL – 5.4-1;
2.12. *Parazitologie medicală,* Ed. ALL, Bucureşti 1994, S.Rădulescu, A.Meyer
2.13. *Baze clinice pentru practica medicală vol IV,* Ed. Medicală, Bucureşti Prof.Dr.Doc. A.Păunescu-Podeanu
2.14. Metodologia anuală de supraveghere şi control a bolii diareice acute (BDA) şi holerei pentru sezonul iunie-noiembrie – Autoritatea de Sănătate Publică
2.15. D.Buiuc, M.Neguţ, *Tratat de microbiologie medicală*, Editura Medicală, Bucureşti, 2008

3. DEFINIŢII ŞI ABREVIERI

3.1. Coprocultură: examen microbiologic al materiilor fecale
3.2. Antibiograma: test de laborator care evidenţiază rezistenţa sau sensibilitatea unui germen patogen (bacterie) la diferite antibiotice.
3.3 Izolare bacteriană: cultivarea bacteriilor pe medii de cultură agarizate prin epuizarea inoculului cu ansa
3.4. Primocultură: izolarea bacteriilor din prelevatele patologice
3.5. Cultură pură: cultură formată din descendenţii unei singure colonii rezulta-te după o epuizare a materialului microbian, care duce la creştere sub forma coloniilor bine izolate pe medii agarizate
3.6. Medii de cultură selective: conţin substanţe care inhibă dezvoltarea bacteriilor de contaminare a prelevatelor; pentru izolarea enterobacteriaceelor din prelevate contaminate există medii cu trei niveluri de selectivitate: slab selective care inhibă bacteriile Gram pozitive , moderat selective care inhibă pe lîngă bacteriile Gram pozitive şi o parte din bacilii Gram negativi comensali şi înalt selective care inhibă o gamă mai largă de bacterii comensale

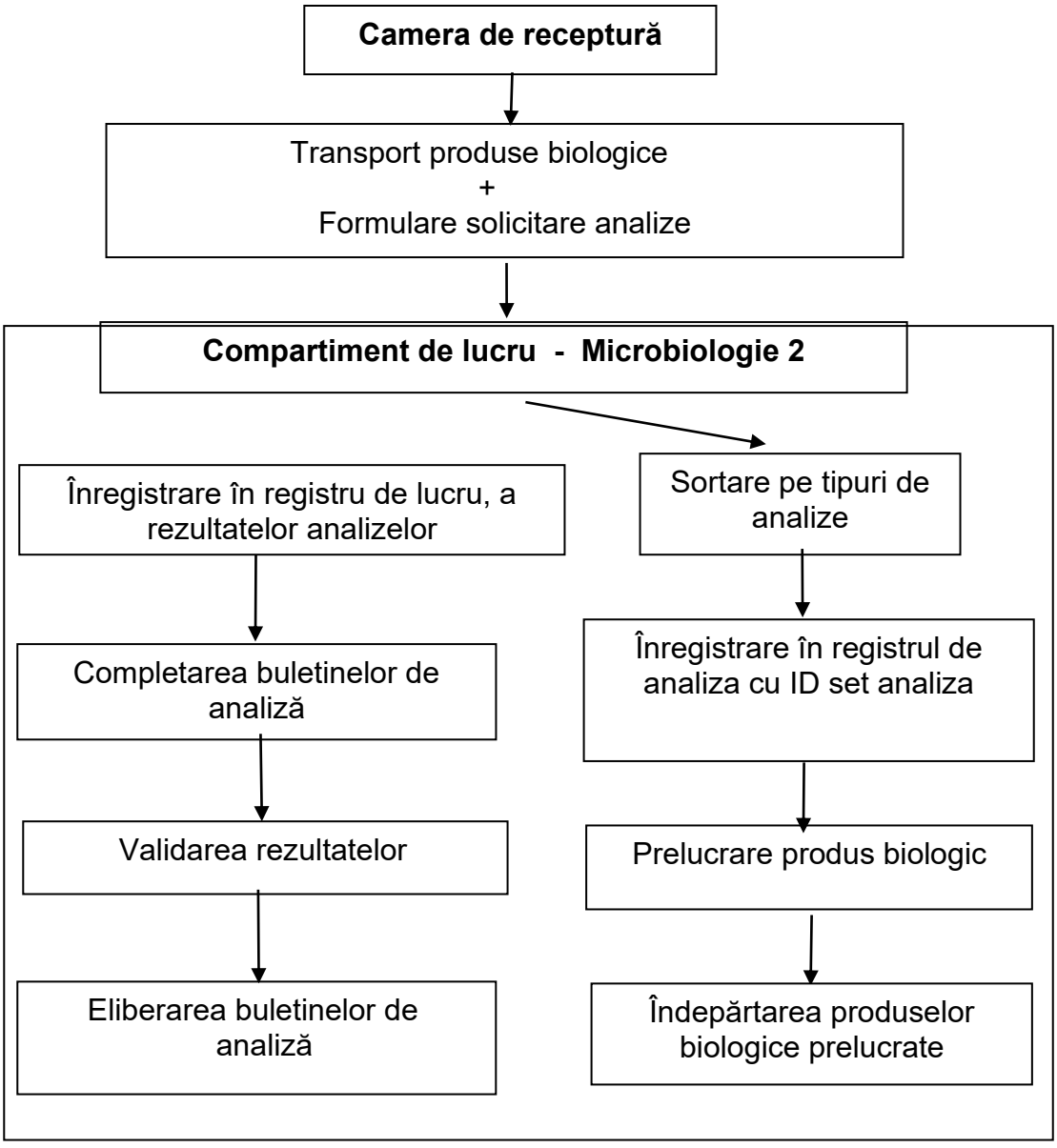
3.7. Medii de îmbogăţire: medii de cultură lichide care prin anumite substanţe inhibitoare, prelungesc faza de lag a bacteriilor de contaminare, fără a întârzia însă intrarea unor patogeni în faza exponenţială.
3.8. Medii diferenţiale: conţin substratul pentru o anumită enzimă bacteriană şi un indicator care atestă atacarea acestui substrat
3.9. Teste biochimice de identificare: teste care se efectuează pe medii speciale de identificare ce conţin anumiţi indicatori şi un substrat , care permit recunoaşterea unei bacterii pe baza activităţii sale biochimice şi identificarea preliminară a acesteia
3.10. Teste serologice (antigenice) de identificare: teste care se efectuează prin reacţii de aglutinare pe lamă sau latex aglutinare ce permit identificarea cu certitudine a unei specii bacteriene

3.2 Abrevieri:
UFC: Unităţi formatoare de colonii
ATCC: American Type Culture Collection
TSI: Triple Sugar Iron (glucoză, zaharoză, lactoză) – mediu de identificare multitest
ADCL: Agar deoxicolat citrat lactoză – mediu moderat selectiv de izolare a Enterobacteriaceelor
MC: Agar Mc Conkey – mediu slab selectiv de izolare a Enterobacteriaceelor
MC-sorb: Agar Mc Conkey cu sorbitol – mediu diferenţial pentru EHEC
AABTL: Agar albastru bromtimol lactoză – mediu diferenţial
WB: Mediul Wilson- Blair – mediu înalt selectiv izolare Salmonella typhi
CIN-Ye: Mediu selectiv de izolare Yersinia
TCBS : Mediu Taurocolat citrat bilă sucroză – mediu înalt selectiv de izolare Vibrio
BSA: Mediu Bilă sare agar – mediu moderat selectiv de izolare Vibrio
AP: Apă peptonată
AP-alc: Apă peptonată alcalină - mediu de îmbogăţire Vibrio
MK: Mediu Karmalli – mediu selectiv Campylobacter
AS: Mediu Agar sânge – mediu nutritiv
TIA: Toxiinfecţie alimentară
EPEC: Enteropatogen Escherichia coli
EHEC: Enterohemoragic Escherichia coli
LA: Latex aglutinare
SF: Ser fiziologic
AD: Apă distilată
MF: Materii fecale
BDA: Boală diareică acută
UV: Ultraviolete

4. DESCRIEREA ACTIVITĂŢII

Activitatea din cursul dimineţii începe prin examinarea culturilor bacteriene dezvoltate în ultimele 24-48 ore, repicarea coloniilor suspecte pe medii de identificare, interpretarea caracterelor biochimice şi identificarea caracterelor antigenice prin aglutinări pe lamă sau latexaglutinare a tulpinilor identificate, examinarea şi interpretarea antibiogramelor efectuate, toate datele fiind consemnate în registrul de analiza. Elaborarea diagnosticului de laborator cu consemnarea acestuia in registrul de analiza si pe formularul de solicitare, este urmata de introducerea lui in SIUI, validarea si eliberarea Buletinului de analiza.

După recepţionarea şi transportul produselor biologice la compartimentul de lucru, activitatea se desfăşoară conform schemei I:


Camera de receptură
Transport produse biologice
+
Formulare solicitare analize
Compartiment de lucru - Microbiologie 2
Înregistrare în registru de lucru, a rezultatelor analizelor
Completarea buletinelor de analiză
Validarea rezultatelor
Eliberarea buletinelor de analiză
Sortare pe tipuri de analize
Înregistrare în registrul de analiza cu ID set analiza
Prelucrare produs biologic
Îndepărtarea produselor biologice prelucrate

4.1.RESURSE NECESARE

4.1.a. Echipamente şi materiale de laborator

- autoclav
- termostat la 37°C şi 42°C
- etuvă
- microscop optic
- hotă cu flux laminar
- frigider(vitrină frigorifică)

- balanţă de precizie
- lampă cu UV
- pH-metru
- bec de gaz Bunsen
- scală nefelometrică McFarland
- lupă
- lame de microscop portobiect şi lamele
- cristalizor
- anse şi fir de însămânţare
- coprocultoare cu linguriţă colectoare şi capac înfiletat
- cutii Petri
- hârtie de filtru
- eprubete 10/10 şi 12/12
- pense
- sticluţe de 8ml
- pipete automate
- vârfuri pipete automate
- psipete/pipete Pasteur
- stative eprubete
- jar de 2,5 l pentru incubare în condiţii speciale
- containere pentru colectarea materialelor contaminate incinerabile
- soluţii dezinfectante (soluţie clorinată şi amestec sulfocromic)
- recipiente pentru soluţii dezinfectante
- medii de cultură
- seruri de aglutinare pe lamă
- truse latex aglutinare
- truse pentru coloraţia Gram şi Ziehl Neelsen cu safranină
- soluţie Lugol
- coloranţi: albastru metilen şi verde malachit
- plicuri pentru incubare microaerofilă (Capygen) şi pentru anaerobioză
- reactivi adiţionali (reactiv Covaci şi reactiv Clorură ferică)
- discuri (benzi/ soluţie) pentru reacţia oxidazei
- perhidrol
- discuri pentru antibiogramă
- ser fiziologic
- ulei de cedru
- ulei de parafină
- parafină solidă

4.1.b. Materiale de referinţă

- tulpini de referinţă ATCC

Salmonella enterica ATCC 51812 TM
Shigella flexner ATCC 12022 TM
Yersinia enterocolitica ATCC 9610
Campylobacter jejuni ATCC 33291
E. Coli O157 H7 nontoxigenic strain NCTC 12900C 1967 I

4.1.c. RESURSE UMANE

- un medic
- doi asistenti de laborator

Măsuri de protecţie a personalului:
toate produsele biologice trebuie considerate potenţial infecţioase şi sunt recoltate şi manipulate conform regulilor de bioprotecţie.

4.2. PRODUSUL BIOLOGIC DE ANALIZAT : materiile fecale

Probele de MF sunt recoltate şi transportate la Laborator conform Manualului de recoltare a produselor biologice MRP-01 în intervalul orar 8^{00}-12^{00}; probele de MF prelevate în afara programului normal de lucru sunt depozitate în frigiderul de gardă (4-8°C), sunt recepţionate, înregistrate şi procesate la contravizită (dacă sunt aduse până la ora de începere a contravizitei), respectiv a doua zi dimineaţa (probe prelevate după încheierea programului de contravizită)

Modul de recepţionare, înregistrare şi transport al produselor biologice în Laborator se desfăşoară în conformitate cu MRP.

Criteriile pentru respingerea probei biologice sunt:
- recipient inadecvat
- lipsa mediului de transport
- cantitate insuficientă de produs biologic
- cantitate prea mare de produs biologic depasind nivelul de mediu de transport
- lipsa datelor de identificare de pe recipient
- lipsa formularului de solicitare

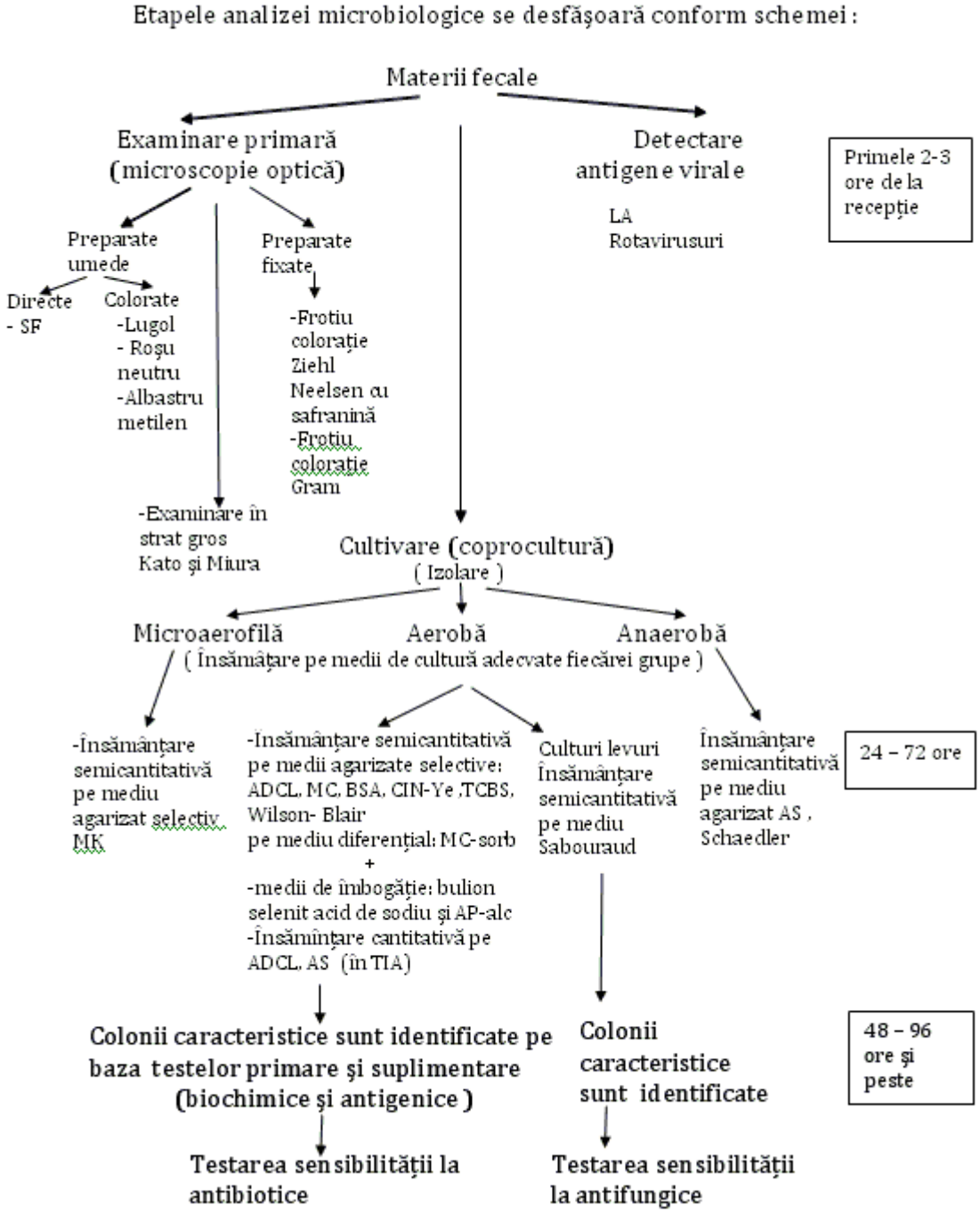
4.3. OPERAŢIUNI PREGĂTITOARE

Mediile de cultură, coloranţii sunt preparaţi conform instrucţiunilor de preparare, de către asistentul de laborator, în camera de preparare , sunt turnate în plăci Petri şi recipiente, în boxa de turnare medii , apoi sunt depozitate în vitrine frigorifice.
Sticlăria reciclabilă (eprubete, sticluţe, flacoane etc.) este pregătită pentru utilizare de către asistentul de laborator.
Materialele (plăci şi flacoane cu medii de cultură preparate) cât şi sticlăria (eprubete, sticluţe) sterilizate şi pregătite pentru utilizare, sunt aduse într-o cantitate estimată pentru 2-3 zile, de către asistentul de laborator ce deserveşte compartimentul de lucru , fiind depozitate în frigider (mediile de cultură) fie în cutii cu capac (eprubete, sticluţe, lame etc.).
Zilnic un număr estimat de plăci cu medii se pun la uscat în termostat înainte de utilizare şi se repartizează câte 2-3 ml mediu de îmbogăţire bulion selenit acid de sodiu, într-un număr estimat de sticluţe sterilizate.

4.4. ETAPELE ANALIZEI MICROBIOLOGICE

Etapele analizei microbiologice se desfăşoară conform schemei II

Schema II


Etapele analizei microbiologice se desfăşoară conform schemei:
Materii fecale
Examinare primară (microscopie optică)
Detectare antigene virale
LA
Rotavirusuri
Primele 2-3 ore de la recepţie
Preparate umede
Preparate fixate
Directe - SF
Colorate -Lugol - Roşu neutru -Albastru metilen
-Frotiu coloraţie Ziehl Neelsen cu safranină -Frotiu coloraţie Gram
-Examinare în strat gros Kato şi Miura
Cultivare (coprocultură) (Izolare)
Microaerofilă
Aerobă
Anaerobă
(Însămânţare pe medii de cultură adecvate fiecărei grupe)
-Însămânţare semicantitativă pe mediu agarizat selectiv MK
-Însămânţare semicantitativă pe medii agarizate selective: ADCL, MC, BSA, CIN-Ye ,TCBS, Wilson- Blair pe mediu diferenţial: MC-sorb
+
-medii de îmbogăţie: bulion selenit acid de sodiu şi AP-alc
-Însămînţare cantitativă pe ADCL, AS (în TIA)
Culturi levuri Însămânţare semicantitativă pe mediu Sabouraud
Însămânţare semicantitativă pe mediu agarizat AS , Schaedler
24 – 72 ore
Colonii caracteristice sunt identificate pe baza testelor primare şi suplimentare (biochimice şi antigenice)
Colonii caracteristice sunt identificate
48 – 96 ore şi peste
Testarea sensibilităţii la antibiotice
Testarea sensibilităţii la antifungice

Etapele examenului microbiologic sunt:
Etapa I în primele 24 ore:
- Examenul microscopic al MF
- Însămânţarea MF pe medii de cultură agarizate şi medii de cultură lichide de îmbogăţire, adecvate categoriei bacteriene, urmată de incubare 15-24 ore;
- Examenul virusologic al MF;

Etapa II după 15-24 ore

- Examinarea culturilor dezvoltate şi repicarea coloniilor suspecte pe bateria minimală de teste biochimice (TSI, mediul cu manită şi un sector de mediu diferenţial AABTL/Drigalski) urmată de incubare 15-24 ore;
- Efectuarea testelor primare -examinarea microscopică a unora din culturile bacteriene (frotiu colorat Gram), testul catalazei ,oxidazei şi coagulazei pentru alte culturi bacteriene;
- Reexaminarea primoculturilor, la 48 ore şi eventuale repicări a coloniilor suspecte dezvoltate tardiv;

Etapa III după 42-72 de ore
- Efectuarea testelor de identificare antigenică (aglutinare pe lamă, latex aglutinări);
- Repicarea coloniilor suspecte pe baterie lărgită de teste biochimice (apă peptonată pentru reacţia indolului, mediu cu lizină şi martor lizină, mediul cu fenilalanină, mediul Simons cu citrat, pe lângă TSI, mediul cu manită şi un sector de mediu diferenţial AABTL/Drigalski, iar pentru alte culturi bacteriene mediul agar cu esculină şi sector de AS) dacă bateria minimală nu a fost concludentă, şi se purifică culturile mixte;
- Efectuarea antibiogramei sau antifungigramei urmată de incubare 24 ore;
- Reexaminarea primoculturilor bacteriene la 72 ore şi eventuale repicări a coloniilor suspecte dezvoltate tardiv;
- Comunicarea rezultatelor examinării microbiologice a MF, prin întocmirea şi tipărirea buletinul de analiză, cod FGL – 5.8-01.

Etapa IV după 72-96 ore şi uneori mai mult
- Comunicarea antibiogramei sau antifungigramei;
- Stocarea culturilor bacteriene patogene şi înalt patogene în eprubete cu agar de stocaj urmată de incubarea lor 24 ore şi parafinarea eprubetelor.

5.0 PROCEDURA DE LUCRU

Examenul microscopic precede executare culturilor bacteriene.

5.1 EXAMENUL MICROSCOPIC:

- Include examinarea de preparate umede şi/sau fixate, având ca scop vizualizarea citologiei respectiv prezenţa sau absenţa recţiei inflamatorii cu sau fără prezenţa hematiilor cât şi a elementelor parazitare (trofozoiţi, chişti, ouă şi larve), a dominanţei fungilor şi prezenţa în exces a unor produşi de digestie (amidon, fibre musculare , mucus etc.)
- Permite identificarea produsului patologic prin depistarea resturilor alimentare nedigerate, si a elementelor de origine intestinala.
- Permite orientarea diagnosticului spre alte posibile etiologii ale BDA, decat cea bacteriana sau existenta unei etiologii mixte.

Elementele componente pe care le putem gasi:
- resturi alimentare nedigerate sau partial digerate`
- elemente de origine intestinala
- elemente de origine parazitara
- bacterii si levuri

A. Resturi alimentare:
- Fibre musculare striate apar ca urmare a ingerarii carnii

cele digerate au aspectul unor fragmente ovale mai mari sau mai mici, cu capete rotunjite si fara striatiuni, de culoare galbena sau galben aurie din cauza bilei; cand sunt

mai palide –transparente, poate denota o retentie de bila

cele partial digerate sau nedigerate au o culoare galben- inchisa si sunt de obicei mai lungi, au capetele drepte si striatii intacte, pastrandu-se atat desenul longitudinal cat si cel transversal; aparitia lor in numar mare, senifica o insuficienta pancreatica asociata sau nu hiposecretie de acid clorhidric sau un tranzit intestinal accelerat

- Grasimile se pot prezenta cel mai frecvent sub forma grasimilor neutre, care in cantitate mica se pot intalni si in mod normal; se prezinta sub forma de picaturi clare, usor galbui din cauza bilei , cu diametrul variabil.Prezenta unei cantitati mari de grasimi neutre, atrage atentia asupra unui proces de maldigestie de obicei printr-o insuficienta pancreato-biliara.
- Amidonul cu solutia Lugol, se coloreaza in albastru-violet inchis daca este nedigerat si in nuante mai deschise sau chiar in rosu , daca este digerat.

Amidonul inclus este cel organizat din interiorul celulelor (cartofi/leguminoase),se coloreaza in albastru si este inconjurat de o membrana.

Amidonul amorf este cel care a pierdut forma sa organizata si se prezinta sub forma de pete sau trasee albastrui.

Amidonul crud se intalneste mai rar si se prezinta ca gramajoare organizate in straturi concentrice, colorate aproape in negru.

Eritrodextrina, rezultata din digestia amidonului, se coloreaza in rosu. In cazul unor preparate bogate in amidon, in coloratia cu solutia Lugol, acestea iau in intregime culoarea inchisa, vizibila cu ochiul liber. Prezenta sa in cantitate mare, este consecinta unui tranzit intestinal mai accelerat.

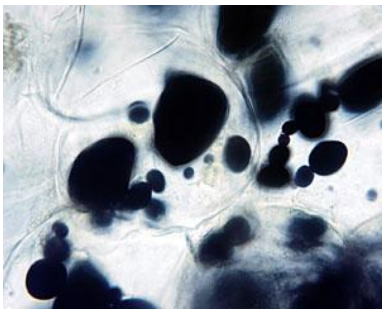
- Celuloza nedigestibila rezultata din alimentele vegetale, se prezinta sub forma de vase vegetale, peri vegetali, spori, graunte de polen, membrane in placarde mai mari sau mai mici, etc. Nu are o semnificatie semiologica.
- Cristale de origine alimentara, in special cristalele de oxalat de calciu intra sau extracelular, in cantitate mare pledeaza pentru o insuficienta gastrica.

B. Elemente de origine intestinala:

- Mucusul se prezinta sub forma unor flocoane transparente ce contin adesea globule rosii, globule albe, celule epiteliale, microbi.In afectiunile inflamatorii se intalneste o cantitate mai mare de mucus.
- Celule epiteliale cilindrice libere sau inclavate in mucus, denota un proces inflamator al peretelui intestinal, atunci cand sunt abundente; uneori se pot intalni si celule pavimentoase detasate odata cu eliminarea scaunului prin canalul anorectal.
- Hematiile intacte denota o hemoragie inferioara (rectala) sau una superioara dar cu un tranzit foarte accelerat; hematiile din hemoragiile digestive superioare nu pot fi recunoscute, fiind distruse.
- Leucocitele, izolate si in numar mic nu sunt semnificative; un numar mare de leucocite trebuie mentionat semnificand un proces inflamator sau ulcerativ care intereseaza segmentul terminal al tubului digestiv; ele abunda in procesele rectale neoplazice sau bacilare, in rectocolita ulcerohemoragica si in diferite boli infectioase cu localizare intestinala, in unelecazuri de dizenterie amibiana sau rectite parazitare, domina eozinofilele.
- Cristale de origine endogena: cristale Charcot-Leyden, au diferite marimi, incolore, se gasesc mai frecvent in diferite parazitoze intestinale. Cristale de hematoidina, de culoare rosie-galbuie sau bruna, romboidale, prismatice, etc. apar dupa diferite hemoragii digestive sau dupa o alimentatie bogata in alimente cu sange.

Cristal de hematoidina

Cristale Charcot-Leyden

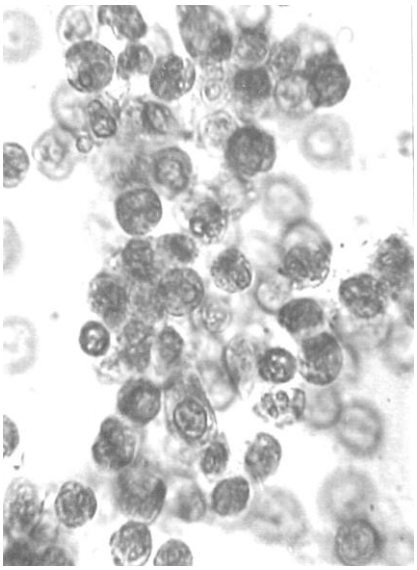


Amidon nedigerat

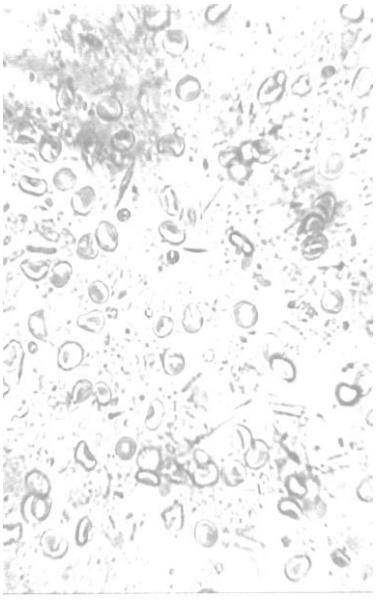
Cristal de acid uric

Lambou cilindric de mucus

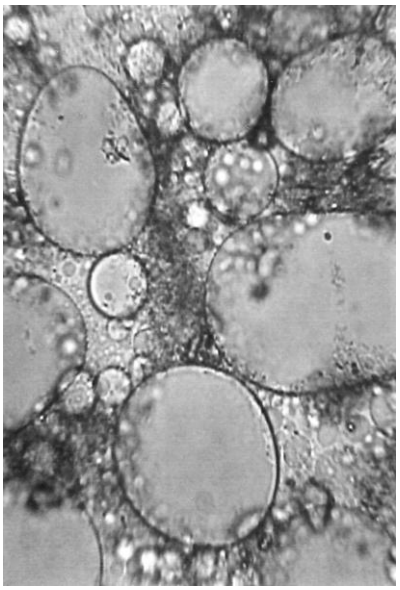
Par vegetal



Reactie inflamatorie – Leucocite



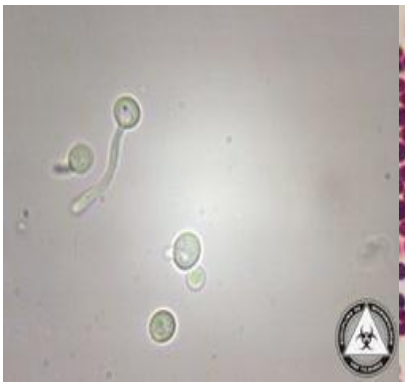
Hematii intacte

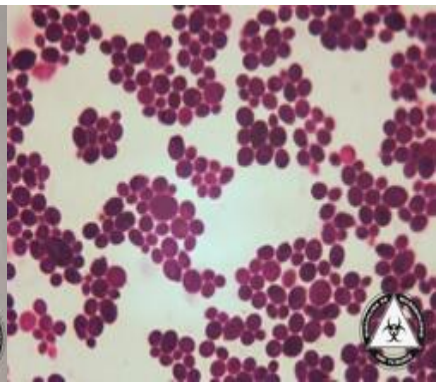


Bule de mucus

C. Elemente de origine parazitara si metodologia lor de identificare , a fost descrisa in PSL-M2-01

D.:Bacterii si levuri: pe preparate necolorate se observa abundenta florei microbiene, eventuala mobilitate a lor, asociata sau nu cu leucocite si hematii ca si prezenta si abundenta unor elemente micologice (levuri, pseudomicelii).


Blastospori cu filamente


Blastospori Gram pozitivi

Granule de polen

5.2 –COPROCULTURA

Coprocultura urmăreşte izolarea şi identificarea bacteriilor patogene şi înalt patogene pe baza caracteristicilor: morfologice , de cultivabilitate, exoenzimatice şi antigenice , implicate în BDA şi TIA

- Însămânţarea se face din proba ca atare recoltată în coprocultor cu mediu de transport Cary Blair, vizând porţiunile lichide şi îndeosebi cele mucoase şi/sau sangvinolente; volumul recoltei trebuie să fie minimum 3-5 mg;
- Mediile de cultură utilizate pentru izolare şi identificare bacteriană, cât şi condiţiile de incubare sunt specifice ficărei categorii bacteriene;
- Inocularea mediilor de cultură se realizează cu ansa, din MF omogenizate în mediul de transport, iar dispersarea inoculului se realizează în 3 grupe de striuri parţial suprapuse, fără flambarea ansei între grupele de striuri; din mediile de îmbogăţire, după o agitare prealabilă a eprubetelor, se procedează la fel; pentru Campylobacter spp., materia fecala se omogenizeaza in prealabil cu Apa peptonata (~5 ml Apa peptonata in eprubeta de 10/100 mm, in care se omogenizeaza materie fecala) si se mentine la temperatura camerei 15-20 minute, in pozitie vericala; dupa sedimentare, se preleva cu o ansa cu bucla mare, din mijlocul coloanei de lichid, si de insamanteaza cu dispersie pe mediul Karmali.
- Repicarea coloniilor suspecte se realizează cu firul de însămânţare, care va fi încălzit la roşu, la începutul şi sfârşitul fiecărei repicări;
- Specia bacteriană urmărită (uzual *Shigella, Salmonella*) este indicată de medicul specialist pe formularul de solicitare analize F-PGL-5.4-1 I Materii fecale; în afara solicitării medicale se urmăresc şi alte specii bacteriene , dacă examenul citologic evidenţiază prezenţa mai ales în număr mare a leucocitelor ± hematiilor (EPEC la nou-născut şi copilul mic, EHEC O:157 H:7, *Campylobacter* spp patogene), iar dacă proba de materii fecale este lichidă ca apa de orez se urmăresc în sezonul cald şi *Vbrio cholerae* / *parahaemolyticus*, *Aeromonas hydrophila* / *sobria* , *Plesiomonas shigelloides* etc. efectuându-se însămânţări pe medii de cultură adecvate;

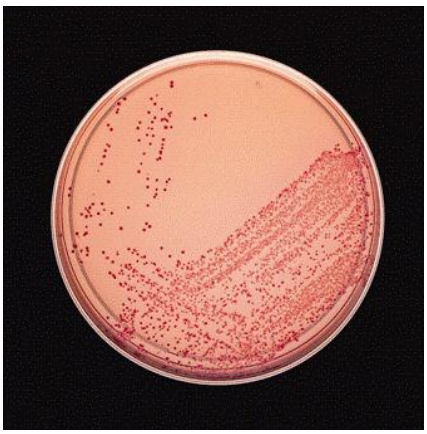
5.2.1 Caracteristici morfologice si de cultivabilitate

Pentru speciile Salmonella, Shigella, Escherichia coli si Yersinia enterocolitica, produsul patologic se insamanteaza pe mediile ADCL, MC-sorb, CIN-Ye si Bulion selenit acid de sodiu. Dupa incubare aeroba la 37°C timp de 16-24 de ore, se examineaza culturile dezvoltate.
Se observă de cele mai multe ori o varietate de colonii , morfologic deosebite, aparţinând unor specii bacteriene diferite. In cazul in care nu se obtin colonii izolate, pentru a obţine culturi pure, se repică si se dispersează pe sectoare de mediu ADCL, pentru a obţine subculturi pure.Dacă

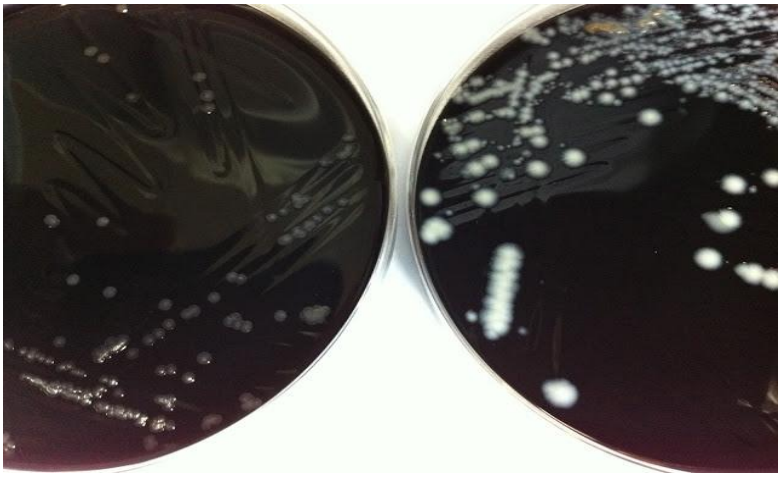
sunt colonii izolate suspecte, se pot însămânţa mediile de cultură pentru identificarea caracterelor biochimice.

Escherichia coli *Salmonella* *Shigella*

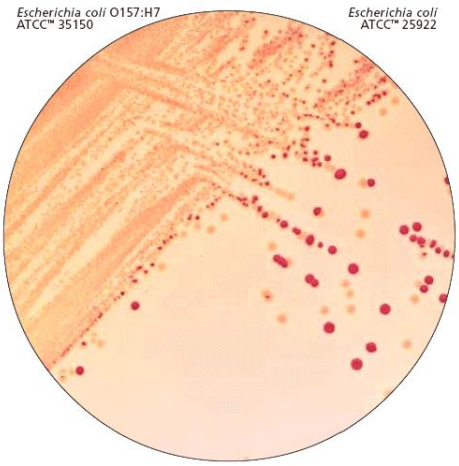
Mediu ADCL



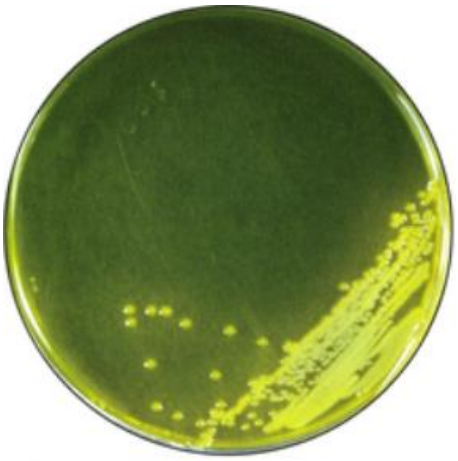
Yersinia enterocolitica (pe mediul CYNYe)



Mediu Karmalli:
Campylobacter spp. in stanga
Coliform in dreapta



Mediu Mc-sorb
EHEC –colonii translucide

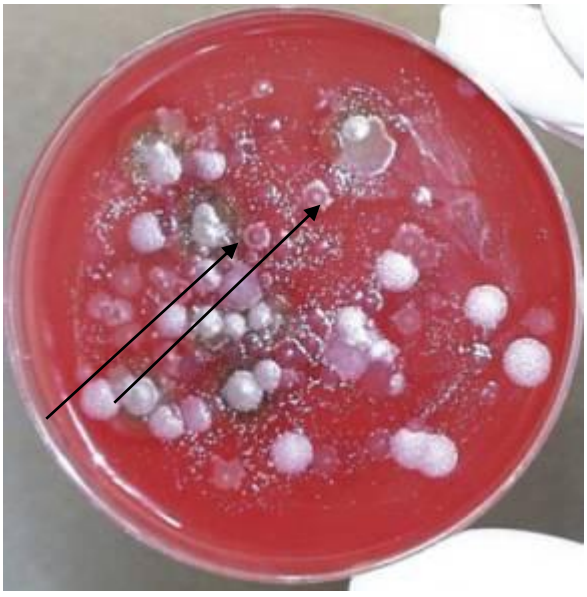


Vibrio cholerae - TCBS agar

Vibrio parahaemolyticus- TCBS agar

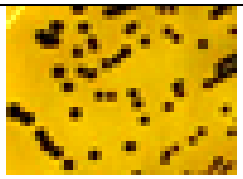
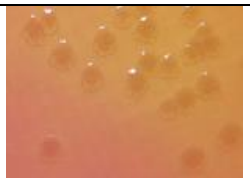
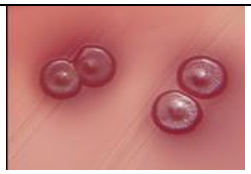
Bacillus cereus - AS

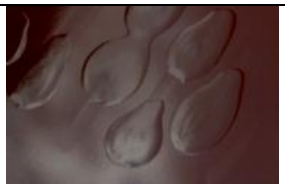
Bacillus cereus - AS

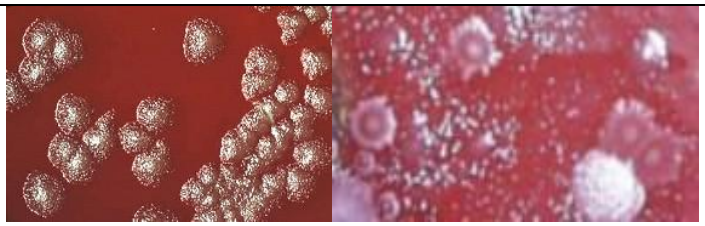


Bacillus antracis- AS

Aspectul coloniilor:

Specia	Aspectul coloniei pe mediul ADCL
Salmonella spp.	 Colonii de 1,5-2 mm, translucide cu central negru, lactoză negative, raportul dintre centrul negru şi periferia translucidă, este în favoarea părţii translucide
Salmonella typhi	 Colonii de 1-2 mm lactoză negative, cu un mic centru negru, care la unele colonii este foarte mic, sau apare mai târziu
Shigella spp.	 Colonii de 2,5-2,5 mm translucide, bombate sau mai aplatizate, lactoză negative
Yersinia enterocolitica	 Colonii 1-1,5 mm translucide, convexe, lactoză negative, care uneori se dezvoltă după 3-5 zile de incubare la temperatura camerei
Escherichia coli	 Colonii roşii sau roz intens, mai mult sau mai puţin opace de 2-3 mm, lactoză pozitive, mai puţin bombate
Proteus spp.	 Colonii mari de 2-3 mm, lactoză pozitive, bombate , cu centrul negru, raportul centrul negru şi partea roşie, este în favoarea centrului, cu miros de ouă clocite, datorită hidrogenului sulfurat.

Klebsiella spp.	 Colonii mari 2-4 mm cu tendinţă de confluare, bombate, convexe, culoare roz intens, în general lactoză pozitive
Yersinia enterocolitica	 Pe mediul CINYe, coloniile sunt de 1-2 mm, translucide cu centrul roşu
Campylobacter jejuni	 Colonii cenusiu-inchis cu tenta maronie si tendinta de a se intinde pe striul de insamantare- mediul Karmali
Vibrio parahaemolyticus	 Aspectul coloniilor pe mediul TCBS
Aeromonas hydrophila	 Aspectul coloniilor pe mediul TCBS
Vibrio cholerae	 Aspectul coloniilor pe mediul TCBS
Bacillus cereus	Colonii hemolitice, cu margini neregulate, La prelevarea coloniei cu ansa, aceasta se desprinde aidoma albusului de ou nebatut

Bacillus antracis	 Coloniile sunt non-hemolitice, plate sau uşor convexe, cu margini neregulate si aspectul sticlă mată. Există de multe ori proiecţii de la marginea coloniei care dau aspectul de " cap de meduza- " La prelevarea coloniei cu ansa, aceasta se desprinde aidoma albusului de ou batut

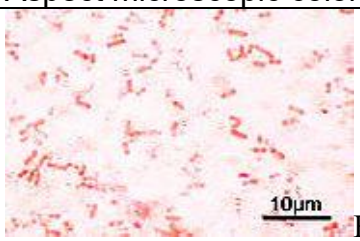
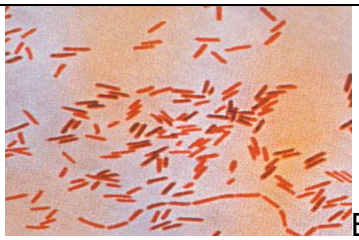
Incubarea pentru Campylobacter spp, se realizeaza la 40-42°C, in jar cu plic Campygen (care creiaza atmosfera de incubare propice cu azot), iar durata incubarii se prelungeste 48-72 de ore. Pentru Yersinia enterocolitica, incubarea la 37°C, a mediului ADCL, se prelungeste 2-3 zile la temperatura camerei- coloniile suspecte dezvoltate in aceste conditii se identifica pe baza caracteristicilor biochimice si antigenice.

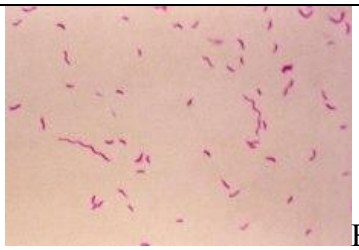
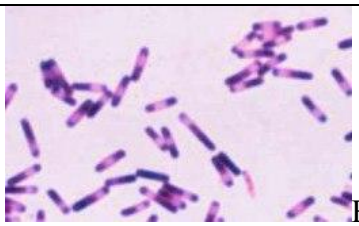
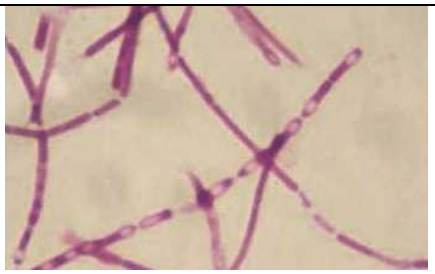
Pentru Vibrio, Aeromonade patogene si Plesiomonas shigelloides, insamantarea initiala se face pe mediul de imbogatire Apa peptonata alcalina si dupa incubare aeroba, se insamanteaza pe mediul BSA si TCBS; examinarea coloniilor dupa 24 h de incubare aeroba, cu efectuarea testelor primare (testul catalazei si testul oxidazei), orienteza diagnosticul.

Pentru Clostridium, insamantarea se face pe mediu special, incubarea in conditii de anaerobioza, in jar.

5.2.2 Examinarea microscopica a culturilor, este necesara pentru unele specii bacteriene: Campylobacter spp. si Vibrio / Aeromonade.

Caracteristici microscopice comparative

Specia bacteriana	Aspect microscopic coloratie Gram
Shigella spp.	 BGN
Salmonella spp.	 BGN

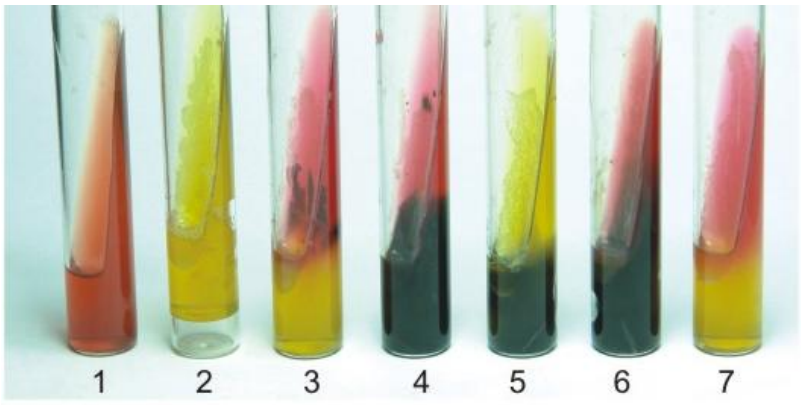
Campylobacter spp.	 BGN spiralati
Clostridium difficile	 BGP sporulati
Clostridium botulinum	BGP sporulati
Vibrio cholerae	
Bacillus cereus	BGP
Bacillus antracis	 BGP sporulati

5.2.3 Identificarea caracterelor exoenzimatice

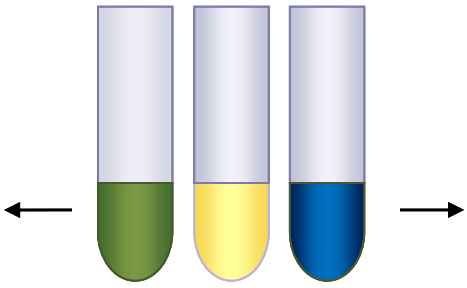
Colonii suspecte se repică pe medii de identificare a caracterelor biochimice. În general se execută 2-3 repicări din colonii diferite, dar asemănătoare morfologic. Repicarea se execută uzual pe mediul TSI si mediul agar cu manită şi uree, (pe care se urmăreşte mobilitatea, fermentarea manitei şi producerea de urează) şi un sector de mediu AABTL(mediu diferenţial pe care bacteriile lactoză pozitive produc virajul mediului în galben , iar cele lactoză negative, lasă mediul

nemodificat.

Mediul TSI



Neînsămânţat *E. coli* *Salmonella typhi* *Proteus spp.* *Citrobacter freundi* *Salmonella typhimurium* *Shigella flexneri*

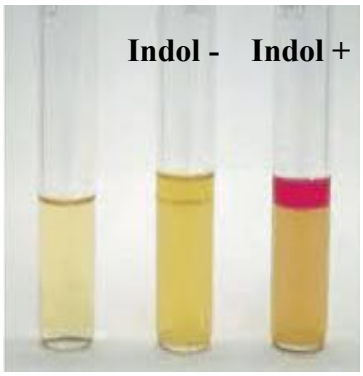


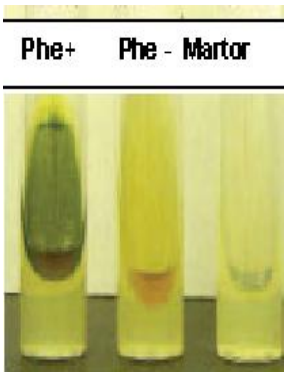
Neînsămânţat Urează pozitiv

Fermentarea manitei

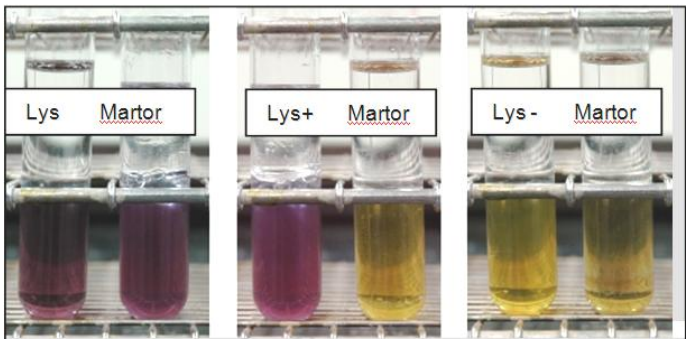
Mediu cu manita

Pentru cazurile neconcludente, se largeste bateria de teste pentru a obtine noi criterii de identificare.





Reacţia indolului Utilizarea citratului ca unică sursă de carbon Dezaminarea Phe



Decarboxilarea lizinei

Caracterele exoenzimatice:

Specia	Mobi-litate	Glu-coza	Lac-toza	Zaha-roza	Hidro-gen sulfurat	Gaz din glucoză	Indol	Li-zină	Ci-trat	Phe	Urea za	Manitol	Oxidaz a
Salmonella spp.	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-
Salmonella typhi	+	-	-	-	+/-	+/-	-	+	-	-	-	-	-
Shigella flexneri	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	- exceptie varianta manita negativa	-
Shigella sonnei	-	+	-	-	-	-	d	-	-	-	-	-	-
Shigella dysenteriae	-	+	-	-	-	-	d	-	-	-	-	+	-
E. coli	+ excepti e E.coli inactiv	+	+	V	-	+	+	d	-	-	-	-	-
Yersinia enterocoliti ca	- 37° + 25°	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-
Campylo bacter spp.	+	-	-	-	-/+	-					-	-	+
Vibro spp.	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+
Aeromonas spp.	+	+	+/-	+/-	-	+/-	+	+/-	-	-	-	+/-	+
Plesiomonas shigelloides	+ (slab)	+	+/-	+/-	-	-	+	+	-	-	-	-	+ aglutina re + cu ser anti Shigella sonnei

5.2.4 Identificarea caracterelor antigenice

Identificarea caracterelor antigenice se realizează cu seruri pentru aglutinarea pe lamă. Pentru *Salmonella* spp. se utilizează:

- Seruri polivalente care conţin aglutinine pentru:

grupele ABDEL (conţine aglutininele 1,2,12 +4,5,12 +9,12 9,46 + 3,10 +3,15 +1,3,19)

şi separat pentru

grupele CFGH (conţine aglutinine 6,7 +6,8 +11+13,22 +13,23 +6,14,24 +8,20)

- Serururi monovalente de grup:

grup B (O:4,5)
grup D (O:9)
grup C (O:6,7,8)
grup E (O:9,12,26)
grup A (O:1,2)

- Ser monovalent Vi
- Seruri flagelare h

Aglutinarea cu unul din serurile polivalente de grup (aglutinare netă, uşor vizibilă cu ochiul liber, în 60 de secunde)denotă apartenenţa tulpinii la una din grupele majore cuprinse în ser; se continuă cu serurile monovalente de grup, grupele B şi D fiind cele mai frecvente, se începe aglutinarea cu ele (aglutinare netă, uşor vizibilă cu ochiul liber, în 60 de secunde)

Dacă nu aglutinează cu nici unul dintre serurile polivalente, şi caracterele exoenzimatice sunt pentru *Salmonella* spp.,se încearcă aglutinarea cu Ser monovalent Vi dacă aglutinează în 30 de secunde, aglutinare netă, vizibilă cu ochiul liber, se poate afirma că tulpina poate fi *Salmonella typhi* sau paratyphi. Se termoinactivează tulpina, şi se reiau aglutinările cu serurile polivalente, monovalente şi seruri h (h::d, h:c, h:a, h:b)

Cu ajutorul serurilor polivalente si monovalente precum si a serurilor h (antigene H) se pot determina serotipurile genului Salmonella conform clasificarii Kauffman–White

Pentru Shigella spp. , sunt seruri:

Polivalent flexneri
Polivalent sonnei
Anti Boydi C1, C2, C3
Antidysenteriae 1-7
Antidysenteriae 8-12

Pentru Yersinia enterocolitica, sunt serul monovalent O3 şi O9.

Pentru EPEC sunt :

Ser nonavalent
Ser trivalent 1 (Mixtură de 3 Serotipuri O111+O55+O26)
Ser trivalent 2 (Mixtură de 3 Serotipuri O86+O119+O127)
Ser trivalent 3 (Mixtură de 3 Serotipuri O125+O126+O128)
Ser trivalent 4 (Mixtură de 3 Serotipuri O114+O124+O142)

- Bacteriile patogene şi înalt patogene izolate şi identificate pe baza testelor biochimice şi antigenice sunt testate pentru sensibilitatea şi rezistenţa la antibiotice si stocate în eprubete cu mediu agarizat de transport, parafinate şi expediate la Institutul „I. Cantacuzino”-Bucureşti, pentru confirmarea identităţii şi tipare bacteriană.

Pentru EHEC O:157H:7 identificarea antigenica se face prin latex aglutinare, kitul continand, martor pozitiv si martor negativ.

Pentru Campylobacter spp. enteropatogene kitul contine carduri dryspot, precum si martor pozitiv si negativ.

5.2.5 COPROCULTURA ÎN TIA

Avand in vedere plurietiologia TIA, metodologia examenului microscopic se aplica si in aceste cazuri iar insamantarile semicantitative se executa pe toate mediile de cultura, inclusiv pe AS, pentru urmarirea stafilococilor, streptococilor si a speciilor de Bacillus in special Bacillus cereus. In paralel se executa coprocultura cantitativa, prin diluarea materiilor fecale in ser fiziologic, astfel incat sa obtinem o dilutie finala de 10^{-5} si $10^{-7,}$ prin insamantarea a 0,1 ml din dilutia 10^{-3} respectiv10^{-5}, pe mediul ADCL si AS. Scopul acestei metode este de a determina specia bacteriana patogena sau conditionat patogena care se gaseste intr-o cantitate mare, peste limita acceptata, pentru continutul materiilor fecale.

NOTA:

Aceasta metodologie de insamantare cantitativa se aplica si in situatiile in care in care medicul clinician solicita coprocultura pentru bacterii conditionat patogene: *Psudomonas aeruginosa, Klebsiella spp, Serratia marcescens* ((sindromul scutecului rosu)., sau se estimeaza proportia coloniilor dezvoltate si identificate din aceeasi specie bacteriana.

Schema dilutiilor pentru coprocultura cantitativa:

Nr. Epriubeta	**1**	**2**	**3**
Ser fiziologic	9 ml	10 ml +	10 ml +
Materii fecale	~ 1 mg (o ansa cu bucla mare)	0,1 ml	0,1 ml
	omogenizare	omogenizare	omogenizare
Dilutia	10^{-1}	10^{-3}	10^{-5}
Cantitate folosita pentru insamantare	-	0,1 ml	0,1 ml
Dilutia finala pe placa	-	10^{-5}	10^{-7}

Dupa 24 ore de incubare, se numara coloniile morfologic identice. Calcul: Nr. Colonii X dilutia. Daca numarul coloniilor dezvoltate este mai mare de 1X 10^{-7} pentru bacterii conditionat patogene (din aceeasi specie bacteriana), atunci acestea pot fi considerate implicate in etiologia TIA.

5.2.6 Coprocultura in micoze intestinale

Se executa la indicatia medicului clinician sau in cazurile in care examenul microscopic depisteaza prezenta levurilor in cantitate mare si dominanta lor in comparatie cu flora bacteriana uneori diminuata pana la disparitie. Izolarea levurilor se face prin cultivare pe mediul Sabouraud . Pentru a incrimina etiologia micotica, intr-un sindrom diareic, este necesar a determina numarul de unitati formatoare de colonii/ gram sau ml materii fecale si identificarea levurilor respective.

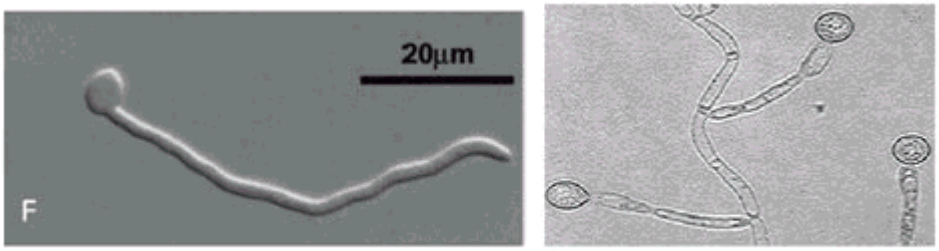
Schema dilutiilor pentru coprocultura cantitativa: pentru levuri

Nr. Eprubeta	**1**	**2**	**3**
Ser fiziologic	9 ml	10 ml +	10 ml +
Materii fecale	~ 1 mg (o ansa cu bucla mare)	1 ml	0,1 ml
	omogenizare	omogenizare	omogenizare
Dilutia	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}
Cantitate folosita pentru insamantare	-	0,1 ml	0,1 ml
Dilutia finala pe placa	-	10^{-3}	10^{-4}

In paralel cu insamantarea cantitativa din dilutiile 2 si 3 , se insamanteaza si din dilutia initiala, prin dispersie cu ansa, pe mediul Sabouraud. Se incubeaza la 25-37° timp de 2-3 zile. Se numara coloniile dezvoltatesi se face calculul levurilor dupa formula: Nr. UFC X dilutia.Daca numarul coloniilor este mai mare de 10^{-9}, acestea pot fi implicate in diareea candidozica. *Candida albicans* , detine rolul major in etiologia micotica a sindromului diareic la imunodeprimati dupa antibioterapie de lunga durata, etc. Alte levuri se pot intalni in scaunul diareic, dar rolul lor in etiologia BDA este discutabila.

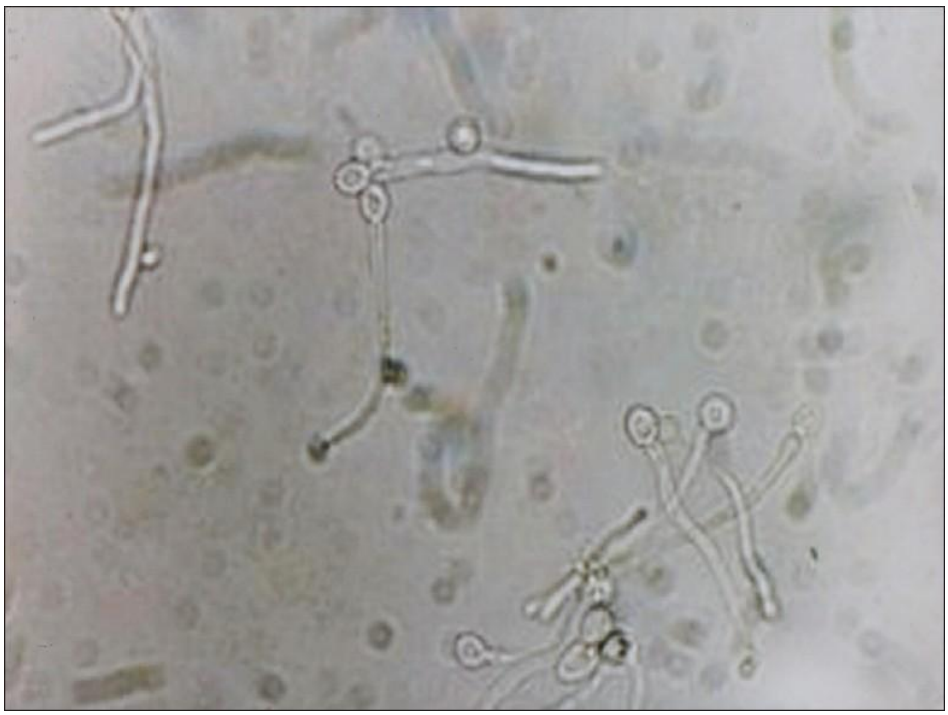
Identificarea pentru *Candida albicans* se bazeaza pe testul de filamentare (testul tubului germinativ)

Candida albicans



Germ Tube (no constriction) Pseudohyphae (constriction)

Diferenta fata de pseudohife



Testul filamentarii

- Se utilizează mediul Sabouraud cu sau fără inhibitori pentru bacteriile aerobe din materiile fecale;

- Însămânţarea MF este identică ca la coprocultura bacteriană, identificarea se realizează prin testul filamentării sau identificare pe galerii API , iar la solicitarea medicului curant se efectueaza antifungigrama.

6.0. CONTROLUL DE CALITATE

Reactivii necesari, mediile de cultură, sunt controlate cu tulpini de referinţă existente la nivelul compartimentului.

Tulpini de referinţă: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Shigella flexneri* ATCC 12022, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Yersinia enterocolitica* ATCC 9610;

Aceste controale sunt introduse în lucru la fiecare lot de medii de cultură achiziţionate sau ori de câte ori este nevoie.

Tulpinile izolate si identificate se expediaza la Institutul „I. Cantacuzino” Bucuresti, pentru confirmarea identitatii bacteriene.

Periodic se executa insamantari paralele, din aceeasi proba biologica si comparari interpersonale (a doua opinie).

7.0 COMUNICAREA REZULTATELOR SI VALORI DE REFERINTA

A.Examen citologic: Valoare de referinta : Absente/rare leucocite

“Rare leucocite (≤ 2-5 leucocite/ camp microscopic-obiectiv 40x)” in holera, viroze, etc.

“Reactie inflamatorie moderata (≥ 20 leucocite/camp microscopic-obiectiv 40x)” in salmoneloze, amoebioza, etc.

„Reactie inflamatorie importanta (≥ 50 leucocite/camp microscopic-obiectiv 40x)”in shigeloze

Dupa caz, se precizeaza prezenta/absenta hematiilor.

B.Examen parazitologic: Valoare de referinta: Absente structuri parazitare

„ Prezent...” – se mentioneaza parazitul identificat

C.Examen micologic: Valoare de referinta: Absente/rare levuri

„ Prezente numeroase levuri/ pseudomicelii”

D. Examen digestie in Lugol: Absenti produsi anormali de digestie

E. Coprocultura: Valoare de referinta: Negativa (se precizeaza specia bacteriana cultivata)

„ Coprocultura pozitiva pentru....” .....(se precizeaza specia bacteriana cultivata si identificata)

F. Coprocultura cantitativa: Valoare de referinta: Negativa la dilutia 10^{-5} si 10^{-7}

„ Nr.colonii x dilutia ”.....(se precizeaza specia bacteriana cultivata si identificata)

7.1 Raportare rezultate:

1. în baza de date a Spitalului
2. medicului curant / pacientului prin Buletinul de analiza
3. Directiei de Sanatate Publica –Iasi, conform metodologiei anuale de supraveghere a teritoriului pentru BDA.

8.0 SURSE DE EROARE

Pot fi cauzate de:

- prelevarea probelor biologice dupa instituirea antibioterapiei
- lipsa mediului de transport care mentine viabilitatea trofozoitilor, larvelor si bacteriilor
- stocarea probelor biologice recoltate in mediu de transport mai mult de 18-24 ore la temperatura camerei ceea ce permite dezvoltarea florei microbiene de asociatie
- etichetare gresita a probei sau inregistrare incorecta in Registrul de comenzi interne/ Registrul de analiza –rezultatul analizei se comunica pentru alt pacient.
- eroare de interpretare a caracterelor biochimice si antigenice al bacteriilor, corectabile prin comparari interpersonale si bilaterale intre intre laboratoare

9. 0 RESPONSABILITĂŢI

MANAGERUL TEHNIC:

- Verifică şi aprobă prin semnătură şi parafează buletinul de analiză, cod FGL- 5.8-01
- Oferă consultanţă beneficiarului în legătură cu rezultatul analizei, dacă acesta solicită
- Execută analizele pentru care este responsabil şi validează rezultatul acestora prin semnătură şi parafă

RESPONSABILUL DE ANALIZĂ

- Verifică solicitarea medicului specialist de pe formularul de solicitare analize
- Verifică înregistrările asistentului de laborator ce deserveşte compartimentul 02, din registrul de lucru
- Examinează preparatele de microscopie optică şi culturile bacteriene dezvoltate pe mediile de cultură, execută repicările, aglutinările pe lamă şi latex aglutinările, interpretează caracterele exoenzimatice dezvoltate de bacterii şi a aglutinărilor pe lamă, respectiv a latexaglutinărilor, decide asupra testelor pe care le execută asistentul de laborator şi formulează diagnosticul de laborator în registrul de lucru
- Întocmeşte şi tipăreşte buletinul de analiză
- Verifică, semnează şi parafează buletinul de analiză, cod FGL-5.8-01 şi îl prezintă managerului tehnic spre aprobare

ASISTENTUL DE LABORATOR

- Preia coprocultoarele cu probe biologice concomitent cu formularele de solicitare analize de la registratorul medical din camera de receptură.
- Înregistrează probele biologice cu toate datele din formularele de solicitare analize, inclusiv ID-ul probelor în registrul de lucru.
- Transportă mediile de cultură şi sticlăria pregătite pentru utilizare, în compartimentul de lucru şi pregăteşte mediile de cultură pentru însămânţare.
- Efectuează însămânţarea produselor biologice pe medii de cultură, pregăteşte preparatele pentru microscopie optică, efectuează unele teste de laborator indicate de medic
- Transmite buletinul de analiză, registratorului medical respectiv asistentului medical de la cabinetul de recoltare

10.0 ÎNREGISTRĂRI ŞI ANEXE

- Registrul de comenzi interne/externe –pentru probele acceptate 4.4. - 01 I E
- Registrul de comenzi respinse- pentru probele necorespunzatoare RGL 4.4- 02
- Registrul de analize RGL – 4.4 – 01 I - MATERII FECALE
- Bulletin de analiza FGL- 5.8 - 01